

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

WAGNER LOESCH VIANNA

**Estudo Comparativo da Eficiência de Diferentes Técnicas
de Mensuração da Concentração Espermática em Suínos**

São Paulo
2006

WAGNER LOESCH VIANNA

Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração
espermática em suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Aníbal de Sant'Anna Moretti

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1656
FMVZ


Vianna, Wagner Loesch
Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos / Wagner Loesch Vianna. -- São Paulo: W. L. Vianna, 2006.
84 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal de Sant'Anna Moretti.

1. Inseminação artificial. 2. Suínos. 3. Concentração espermática.
I. Título.



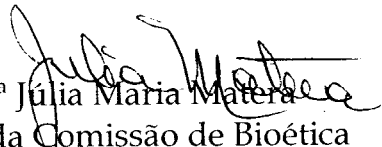
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em reprodutores suínos", protocolo nº516/2004, utilizando 55 suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Efficiency evaluation of different sperm concentration techniques in boars", protocol number 516/2004, utilizing 55 swine, under the responsibility of Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 21 de setembro de 2004


Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VIANNA, Wagner Loesch

Título: Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Dedico esta tese aos meus
pais e irmãos que sempre me
apoiaram e confiaram em mim

*Camila,
Muito obrigado por tudo.*

(“2235”)

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Aníbal de Sant'Anna Moretti, pela sua orientação e amizade.

Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabé pelo apoio e co-orientação.

À **Suinocultura Rossetto**, pelo apoio na condução da pesquisa.

Ao curso de **pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal**, pela oportunidade mais uma vez confiada a mim.

Ao **Prof. Dr. Nelson Ithiro Tanaka** e ao **Bacharel em Estatística Paulo Henrique de Souza Lima**, Instituto de Matemática e Estatística – Universidade de São Paulo.

À **Cris, Alessandra e Harumi**, pela pronta ajuda quando necessária.

Ao **Prof. Paulo Henrique Mazza Rodrigues**, pelo auxílio quando solicitado.

Aos **Médicos Veterinários André Namindome e Daniel Gonçalves Bruno (67ª turma)**, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

À **CAPES**, pela bolsa concedida.

Aos meus **pais, irmãos e sobrinhos**, a minha conquista também é de vocês.

A todos **moradores da casa do VRA e NAPGAMA**, pelo companheirismo e convivência.

A todos os **AMIGOS DA FACULDADE**, com muitas saudades.

À **Multimix Nutrição Animal Ltda**, pela oportunidade e aprendizado.

VIANNA, W. L. **Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos.** [Efficiency of different measurement techniques of sperm concentration in swine]. 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A inseminação artificial (IA) é uma técnica cada vez mais utilizada na suinocultura moderna, pois propicia ao suinocultor vantagens quanto ao desempenho dos reprodutores, ao controle dos cruzamentos e à facilidade na introdução de material genético. Entretanto, a produção de doses inseminantes com qualidade é um dos principais fatores envolvidos no sucesso da técnica. Nesse contexto, a adequada mensuração da concentração espermática do ejaculado suíno é parte fundamental da rotina de trabalho de Centrais de Inseminação Artificial em Suínos. Foram realizados dois experimentos onde se objetivou: Experimento 1 – avaliar a acurácia, a precisão e a robustez do volume do ejaculado do Espermiodensímetro de Karras (ESPM) e do Espectrofotômetro (ESPT), em comparação à Câmara de Neubauer (CN), técnica padrão e também produzir uma tabela de correção de escala do ESPM; Experimento 2 – avaliar o tempo gasto e a repetibilidade de cada técnica, além de comparar a tabela ajustada do ESPM produzida no Experimento 1 com a tabela padrão do ESPM. Utilizaram-se 141 ejaculados, que revelaram concentrações espermáticas médias (milhões de sptz/mL) e número médio de doses que poderiam ser produzidas, respectivamente de 229,1 e 22,6; 185,0 e 18,5; 283,6 e 28,0 para a CN, o ESPT e o ESPM. O viés médio (acurácia) obtido através da média da diferença do resultado da técnica alternativa e da técnica padrão, e o desvio-padrão do viés médio (precisão) do ESPT, em comparação à CN, foram, respectivamente de - 44,1 e 52,6, enquanto que para o ESPM foram de 54,5 e 44,8 (milhões de sptz/mL). Observou-se que o ESPT tende a subestimar e o ESPM a superestimar a concentração espermática, em comparação à CN. O ESPT foi igualmente preciso e mais acurado que o ESPM. Houve pouca

influência do volume do ejaculado sobre os resultados do ESPM e do ESPT através dos resultados de robustez para o volume do ejaculado. O ESPM apresentou maior repetibilidade e menor tempo gasto para a realização dos exames, seguido do ESPT e, por último, da CN ($P < 0,05$). A tabela produzida com os dados do Experimento 1 apresentou resultados mais aproximados aos da CN, em comparação com a tabela padrão do ESPM (2,96 bilhões de espermatozoides vivos/dose vs 2,36 bilhões de espermatozoides vivos/dose, respectivamente). Maiores informações de outras Centrais de Inseminação Artificial em Suínos (CIAS) sobre o uso a campo da tabela ajustada produzida, denominada “Tabela Ajustada para o Espermiodensímetro LPS-FMVZ-USP”, seriam úteis para comprovar a sua eficiência a campo.

Palavras-chave: Inseminação artificial. Suínos. Concentração espermática.

VIANNA, W. L. **Efficiency of different measurement techniques of sperm concentration in swine.** [Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos]. 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Artificial Insemination (AI) in swine is a rising technique that has been used during the last years at the swine production systems, because it furnish several advantages to the producers just like boar high efficiency, better breeding control and easiness in introducing foreign genetic materials. Nevertheless, high quality insemination doses output is one of the most important factors involving the technique success. In this manner, a correct measurement of the spermatic concentration of boars is a basic work routine of the Swine Artificial Insemination Centers (CIAS). Two trials had been performed, whose objectives were: Experiment 1 – evaluate the accuracy, precision and robustness for ejaculation volume of Spermdensimeter (ESPM) and Spectrofotometer (ESPT) in relation to the Neubauer Count chamber (CN), designed as the standard technique. Moreover, produce a scale correction of the ESPM table; Experiment 2 – evaluate the spent time and repetitiousness of each technique, and compare the ESPM adjusted table produced in Experiment 1 with the ESPM standard table. A total of 141 boar ejaculation was used for spermatic concentration measurement by the techniques described above. The average spermatic concentrations (10^6 spztz/mL) and average doses number were, respectively: 229.1 and 22.6, 185.0 and 18.5, 283.6 and 28.0 for CN, ESPT and ESPM. ESPT mean bias (accuracy) and standard deviation bias (precision), in relation to the CN were, respectively -44.1 and 52.6, while ESPM were 54.4 and 44.8 (10^6 spztz/mL). Through these results its possible to conclude that ESPT has a tendency to subestimate and ESPM to superestimate the spermatic concentration in relation to

the CN. ESPT was more accurate and equally precise than ESPM. Little effect of ejaculation volume on accuracy and precision in both techniques (ESPM and ESPT) was confirmed by the robustness results. ESPM presented a minor coefficient of variation and timeless, followed by ESPT, and finally by CN ($P < 0,05$). The adjusted table produced with Experiment 1 data presented similar results to CN, in relation to the ESPM standard table (2.96 billion of lives sptz/dose vs 2.36 billion of lives sptz/dose, respectively). Complementary data from others CIAS about field use of the ESPM adjusted table produced, named “Adjusted Table for Karras Spermdensimeter LPS-FMVZ-USP”, would be useful to prove its efficiency.

Key words: Artificial insemination. Swines. Spermatic concentration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tabela do Espermiodensímetro de Karras – São Paulo – 2006.....	39
Tabela 2 –	Tabela do Espectrofotômetro – São Paulo – 2006.....	40
Tabela 3 –	Resultados descritivos das técnicas de mensuração da concentração Espermática – São Paulo – 2006.....	48
Tabela 4 –	Estatísticas do Número de espermatozóides por dose ($N^{\circ}\text{Esp} \times 10^6$) em relação à Câmara de Neubauer – São Paulo – 2006.....	49
Tabela 5 –	Acurácia e Precisão do Espermiodensímetro e Espectrofotômetro – São Paulo – 2006.....	52
Tabela 6 –	Contagem das duplas de mensuração dos Técnicos 1 e 2 – São Paulo – 2006.....	58
Tabela 7 –	Tabela de contingência entre as variáveis Tipo de Discordância e Categoria de Mensuração – São Paulo – 2006.....	59
Tabela 8 –	Estimativa das Proporções dos Tipos de Concordância – São Paulo – 2006....	60
Tabela 9 –	Comparação do tempo e coeficiente de variação (repetibilidade) do Espermiodensímetro, Espectrofotômetro e Câmara de Neubauer – São Paulo – 2006.....	61
Tabela 10 –	Estatísticas descritivas da concentração espermática da CN nas categorias da concentração espermática do ESPM – São Paulo – 2006.....	63
Tabela 11 –	Tabela de calibração da concentração espermática da CN para cada uma das categorias da concentração espermática de ESPM – São Paulo – 2006.....	64
Tabela 12 –	Tabela de Karras e Tabela Ajustada LPS-FMVZ-USP (Concentração pela CN = $-12,80 + 0,85$. Concentração pela tabela de Karras) – São Paulo – 2006.....	65
Tabela 13 –	Estatísticas descritivas do número de espermatozóides por dose ($N^{\circ}\text{Esp./dose}$) ao adotar o ajuste do Modelo (1) em ESPM – São Paulo – 2006....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Cachaço em baía com maravalha.....	36
Figura 2 –	Contagem dos espermatozóides na Câmara de Neubauer.....	37
Figura 3 –	Espermiodensímetro de Karras.....	38
Figura 4 –	Espectrofotômetro utilizado.....	40
Figura 5 –	Diagrama do Delineamento do Experimento 1.....	41
Figura 6 –	Diagrama do Delineamento do Experimento 2.....	43
Figura 7 –	Histograma da distribuição do número de espermatozóides por dose ($\times 10^6$) – ESPT.....	50
Figura 8 –	Histograma da distribuição do número de espermatozóides por dose ($\times 10^6$) – ESPM.....	50
Figura 9 –	Gráfico de dispersão da concentração pelo ESPT x concentração pela Câmara de Neubauer com ajuste da regressão linear.....	51
Figura 10 –	Gráfico de dispersão da concentração pelo ESPM x concentração pela Câmara de Neubauer com ajuste da regressão linear.....	51
Figura 11 –	Robustez do Espectrofotômetro.....	53
Figura 12 –	Robustez do Espermiodensímetro.....	53
Figura 13 –	Gráfico de dispersão da concentração espermática pela Câmara de Neubauer x <i>Idade</i>	54
Figura 14 –	Gráfico de dispersão de Resíduo do ESPT em relação à CN x <i>Idade</i>	55
Figura 15 –	Gráfico de dispersão de Resíduo do ESPM em relação à CN x <i>Idade</i>	55
Figura 16 –	Histograma da distribuição da diferença entre as medidas de concentração dos técnicos 1 e 2 do método ESPM.....	56
Figura 17 –	Gráfico de dispersão da distribuição da diferença entre as medidas de concentração espermática pelo ESPM dos Técnicos 1 e 2 em função da Concentração espermática pela Câmara de Neubauer.....	57

Figura 18 –	Gráfico de dispersão da concentração espermática da CN (Conc-CN) x concentração espermática do ESPM (Conc-ESPM) no Experimento 1.....	62
Figura 19 –	Gráfico de dispersão do desvio padrão da concentração espermática da CN (Conc-CN) x concentração espermática do ESPM (Conc-ESPM) no Experimento 1.....	63
Figura 20 –	Análise de resíduos do ajuste do modelo em ESPM.....	66
Figura 21 –	Gráfico de dispersão da calibração de ESPM nos dados do Experimento 2.....	67
Figura 22 –	Dispersão de resíduos da calibração de ESPM no Experimento 2.....	67
Figura 23 –	Histograma do número de espermatozoides por dose – Calibração de ESPM.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

c_i	Concentração na i-ésima categoria
ε_{ik}	Efeito aleatório ocorrido na k-ésima observação da i-ésima categoria
μ_j	Valor esperado de Y_{ik} , quando a concentração ESPM é c_i
Y_{ik}	Concentração da CN mensurada na k-ésima observação da i-ésima categoria
χ^2	Qui-quadrado
a, b	Parâmetros da variação linear da média da CN em relação à c_i
ATP	Adenosina tri-fosfato
CASA	Computer Assisted Semen Analyzer
Cat.	Categoria
CIAS	Central de Inseminação Artificial em Suínos
CN	Câmara de Neubauer
ConcCN	Concentração espermática avaliada por meio da câmara de Neubauer ($\times 10^6$ spz/mL)
ConcESPM	Concentração espermática avaliada por meio do Espermiodensímetro (em 9 níveis - 120, 150, 180, 210, 245, 295, 375, 485 e 635 $\times 10^6$ spz/mL);
ConcESPM1	Concentração espermática avaliada por meio do espermiodensímetro e Técnico 1 (em 9 níveis - 120, 150, 180, 210, 245, 295, 375, 485 e 635 $\times 10^6$ spz/mL)
ConcESPM2	Concentração espermática avaliada por meio do espermiodensímetro e Técnico 2 (em 9 níveis - 120, 150, 180, 210, 245, 295, 375, 485 e 635 $\times 10^6$ spz/mL)
ConcESPT	Concentração espermática avaliada por meio do espectrofotômetro (em 12 níveis - 70, 110, 140, 170, 210, 240, 280, 320, 350, 380 e 450 $\times 10^6$ spz/mL)

CV	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
ESPM	Espermiodensímetro
ESPT	Espectrofotômetro
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido
HTR	Hamilton Thorne Computer-based Semen Analyzer
IA	Inseminação Artificial
IAIU	Inseminação Artificial Intra-Uterina
k ₁ , k ₂	Parâmetros da variação linear do desvio padrão da CN em relação à c _i
LH	Hormônio Luteinizante
Lim. Inf.	Limite inferior
Lim. Sup.	Limite superior
LPS-FMVZ-USP	Laboratório de Pesquisa em Suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
Máx	Máximo
Mín	Mínimo
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro quadrado
mm ³	Milímetro cúbico
N	Número de observações
NaCl	Cloreto de Sódio
Nº	Número
NPARIWAY	Non Parametric One Way
P	Probabilidade

Q1	Primeiro Quantil
Q3	Terceiro Quantil
R ²	Coefficiente de Determinação da Regressão
Res-ESPM	Resíduo do Espermiométrico
s	Segundos
Sptz	Espermatozóides
TCN	Tempo gasto nas 5 mensurações da Câmara de Neubauer (<i>em s</i>)
Tec1	Técnico número 1
Tec2	Técnico número 2
TESPM	Tempo gasto nas 5 mensurações do Espermiométrico (<i>em s</i>)
TESPT	Tempo gasto nas 5 mensurações do Espectrofotômetro (<i>em s</i>)
Vol	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	22
3	REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1	DURAÇÃO DE ESTRO E ESQUEMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	25
3.2	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DO CACHAÇO.....	26
3.2.1	Concentração espermática.....	27
3.2.2	Motilidade.....	29
3.3	INFLUÊNCIAS DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES VIÁVEIS NA DOSE INSEMINANTE.....	30
3.4	PROBLEMAS EM RELAÇÃO AOS ERROS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES NA DOSE INSEMINANTE.....	31
3.4.1	Problemas na superestimação da concentração espermática do ejaculado.....	32
3.4.2	Problemas na subestimação da concentração espermática do ejaculado.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	LOCAL.....	35
4.2	ANIMAIS E INSTALAÇÃO.....	35
4.3	EXAME DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA DO EJACULADO.....	36
4.4	EXPERIMENTO 1	41
4.5	EXPERIMENTO 2.....	42
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.6.1	Experimento 1.....	44
4.6.2	Experimento 2.....	46
5	RESULTADOS	47
5.1	EXPERIMENTO 1.....	48
5.2	EXPERIMENTO 2.....	60

5.3	CORREÇÃO DE ESCALAS DO INSTRUMENTO ESPM.....	61
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica utilizada na reprodução da espécie suína desde a década de 30 e até então evolui progressivamente, demonstrando sua influência na eficiência reprodutiva dos sistemas de produção.

Muitas são as vantagens da IA em comparação com a monta natural, como melhorar eficiência na utilização dos machos destinados à reprodução, redução dos custos de produção, melhoramento genético, segurança sanitária, maior higiene durante a prática de inseminar, eliminação de ejaculados impróprios, preservação de linhagens selecionadas de alta produtividade, uma vez que possibilita a utilização de sêmen congelado, mesmo após a morte do doador, e facilitação do escalonamento semanal dos lotes de matrizes a serem inseminadas.

Para que um programa de IA tenha sucesso um dos fatores que se deve atentar é a concentração do sêmen do macho destinado à reprodução, cuja estimativa deve ser precisamente determinada. A mensuração incorreta da concentração espermática pode levar a problemas de infertilidade ou a prejuízos econômicos para o sistema de produção.

A superestimação da concentração espermática de um ejaculado significa que a concentração mensurada é maior que a concentração real do ejaculado.

Isto representa que um número menor que o ideal de espermatozóides conseguem atingir o oviduto e estarem presentes no momento da ovulação, além de fatores que ocorrem naturalmente como refluxo de sêmen durante a inseminação, fagocitose dos espermatozóides por células de defesa da própria fêmea e mortes de espermatozóides durante o percurso do final da cérvix até o oviduto.

Outra consequência da superestimação da concentração espermática seria adicionar mais diluidor e com isso diminuir a quantidade de plasma seminal da dose inseminante, ocasionando alterações no momento e no número de ovulações da fêmea, já que os componentes do plasma seminal influem no pico de LH na fêmea (STRATMAN; SELF, 1960). Estes fatores podem levar à queda da fertilidade no rebanho, pelo incremento do retorno ao estro devido às falhas na fertilização, ou ainda à diminuição do tamanho da leitegada, acarretando prejuízos ao criador.

Em uma situação contrária, se a concentração espermática for subestimada, ou seja, a concentração mensurada for menor que a concentração real, haverá uma menor utilização do potencial genético dos machos utilizados na granja e, conseqüentemente, uma elevação dos custos da dose inseminante.

Em face destas informações, é muito importante que se tenha à disposição meios eficientes e precisos para quantificar o número de espermatozóides do ejaculado de cachos destinados à reprodução.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

EXPERIMENTO 1 - Comparar diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos, avaliando a acurácia, precisão, robustez para volume do ejaculado da Câmara de Neubauer, do Espermiométrico e do Espectrofotômetro, em um sistema de produção de suínos. Avaliar as disparidades entre as mensurações das concentrações espermáticas realizadas por dois diferentes técnicos através do espermiométrico. Além disso, estabelecer um ajuste de escala do Espermiométrico em relação a Câmara de Neubauer, técnica padrão.

EXPERIMENTO 2 – Avaliar o tempo gasto e a repetibilidade (coeficiente de variação de cada técnica). Avaliar o ajuste de escala do espermiométrico criado no experimento 1.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Assim como a inseminação artificial (IA) é de vital importância para a suinocultura atual, a determinação da qualidade do sêmen utilizado é essencial, pois, poderemos ter no plantel problemas de infertilidade e subfertilidade refletidos no aumento do retorno de cio, diminuição na taxa de parto e tamanho da leitegada (GARCÍA RUVALCABA et al., 1999).

Várias são as causas que influenciam a qualidade do sêmen do cachaço: instalação, tipo de alojamento, “status” sanitário, vacinação, nutrição, intervalo entre colheitas de sêmen, idade e condições ambientais, principalmente o estresse térmico. O sêmen sujeito a temperaturas de 42,5 °C por 45 minutos revela alterações em todos os parâmetros de avaliação dos espermatozoides, como motilidade, porcentagem de células vivas e modificações na concentração de ATP intracelular e taxa de reações acrossomais espontâneas (TARDIF et al., 1999).

3.1 DURAÇÃO DE ESTRO E ESQUEMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

O estro em fêmeas suínas varia de 36 a 100 horas, sendo que a ovulação tem início no seu terço final (SOEDE; KEMP, 1997). Vários estudos vêm sendo conduzidos visando estabelecer um calendário ótimo para inseminação de porcas e marrãs através da determinação do momento ideal de inseminação, do intervalo ideal entre inseminação-ovulação e do número adequado de inseminações por estro.

Inseminações em um período variando de 0 a 24h antes da ovulação têm apresentado resultados satisfatórios quanto à fertilização (KEMP; SOEDE, 1997). Já um intervalo muito longo entre a inseminação e ovulação resulta em perdas embrionárias.

As variações no desenvolvimento de embriões e a porcentagem de porcas com fertilização parcial dos oócitos aumentam muito quando o intervalo entre inseminação e ovulação excede 24h. Não se sabe ao certo porque isso ocorre, mas há evidências de que após esse intervalo de tempo, os espermatozóides capacitados que estavam armazenados no reservatório, início da junção útero-tubárica e oviduto, passam a perder a sua capacidade fecundante (KEMP; SOEDE, 1997).

Quanto à frequência de inseminação, concluiu-se que fêmeas inseminadas três vezes no estro não apresentam taxas de parto e tamanho de leitegada superiores às inseminadas uma vez. Em marrãs, os índices foram melhores para as inseminadas duas vezes, ao invés de uma (XUE et al., 1998). No entanto, a utilização no campo de apenas uma dose inseminante por cio representa ainda um grande risco, já que em condições experimentais há um cuidado maior em todos os procedimentos de manejo.

3.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DO CACHAÇO

A seguir serão apresentadas as principais técnicas de análise do ejaculado em suínos para a determinação das doses inseminantes.

3.2.1 Concentração espermática

As determinações da concentração de espermatozóides, da motilidade, assim como do volume do ejaculado, definem o número de doses inseminantes a serem produzidas. Existem vários métodos de determinação da concentração espermática, dentre eles a Câmara de Neubauer, o Espermiodensímetro e o Espectrofotômetro.

A Câmara de Neubauer proporciona uma avaliação precisa, porém exige maior demanda de tempo durante a análise (PAULENZ et al., 1995).

Outro trabalho, porém, afirma que essa precisão não é tão exata, chegando a relatos de diferenças em até 20% entre a contagem duplicada de uma mesma amostra, realizada por um mesmo técnico (EVENSON et al., 1993).

Alguns estudos apontam o coeficiente de variação dessa técnica como sendo de 12,3% (PAULENZ et al., 1995); outros, como sendo de apenas 10% (SOKOL et al., 2000).

Outras vantagens desse método são seu baixo custo (TOMLINSON et al., 2001) e a contagem direta da célula espermática (EVENSON et al., 1993).

Brillard e Mcdaniel (1985) verificaram o tempo gasto para realização das mensurações de concentração espermática empregando a Câmara de Neubauer e o Espectrofotômetro, o tempo gasto entre o preparo das amostras e de leitura foi de 540 segundos para a Câmara de Neubauer, com o coeficiente de variação de 17,9%, enquanto que para o fotômetro, este tempo foi reduzido para apenas 137 segundos, com coeficiente de variação de 2,24% .

Existem também outras desvantagens inerentes a esta técnica e que não estão relacionadas com o tempo consumido, mas associam-se aos resultados que se tornam menos

precisos com o aumento da diluição, pois há sobreposição dos espermatozóides ou com o mal preenchimento da câmara (PAULENZ et al., 1995).

O Espermiodensímetro é uma outra técnica de mensuração da concentração espermática, que se baseia no grau de turbidez ou densidade do ejaculado. Não foram encontrados na literatura estudos que nos indicassem a precisão desse método, nem de suas vantagens ou desvantagens. Entretanto, pode-se levantar a hipótese de menor precisão do espermiodensímetro comparado com os outros dois métodos, pois esta técnica permite um maior grau de subjetividade da pessoa que estiver fazendo a leitura desta técnica, além da densidade do ejaculado ser influenciada pelo número de leucócitos, por presença de proteínas no plasma seminal, por sujidades e células de descamação, alterando o valor real da técnica.

O espectrofotômetro consiste em uma técnica onde a leitura da concentração espermática se faz através do grau de absorbância de luz no ejaculado.

O resultado é comparado com o obtido em uma tabela previamente preparada, utilizando a equação de regressão de uma amostra de sêmen de concentração aproximada por técnica padrão.

Trata-se de um método mais rápido que o da Câmara de Neubauer, com a desvantagem de que as concentrações de espermatozóides só podem ser avaliadas dentro de uma certa faixa de comprimento de onda e de que a curva de calibração não será válida para todos os cachaços, pois a quantidade de luz difundida pelos espermatozóides em suspensão depende de seus tamanhos, formas e índices de refração (variações individuais dos cachaços).

Assim como no espermiodensímetro, o resultado do espectrofotômetro sofre influência de células de descamação, proteínas plasmáticas, leucócitos e sujidades.

A relação linear entre a densidade óptica e a espermática oferece uma rápida estimativa do número de espermatozoides, no entanto, perde um pouco de precisão com o sêmen de mamíferos, devido à presença de proteínas plasmáticas (CIERESZKO; DABROWSKI, 1993).

O coeficiente de variação do espectrofotômetro é muito baixo em comparação com o da Câmara de Neubauer, tornando a primeira técnica menos subjetiva (PAULENZ et al., 1995).

3.2.2 Motilidade

Outro parâmetro que devemos avaliar no sêmen do cachaco é a motilidade dos espermatozoides, pois nos dá informações sobre a fertilidade do sêmen.

Há evidências de que a porcentagem de motilidade dos espermatozoides está relacionada com a fertilização *in vivo*, ao se aplicar uma dose com motilidade abaixo da ideal (TARDIF et al., 1999). No entanto usou-se uma dose de $0,3 \times 10^9$ espermatozoides/dose, dose muito aquém da dose usual de 3×10^9 espermatozoides/dose.

A motilidade pode ser medida através do microscópio de aumento, com a avaliação visual da porcentagem de espermatozoides vivos no campo.

3.3 INFLUÊNCIAS DO NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES VIÁVEIS NA DOSE INSEMINANTE

Na IA, grande quantidade de sêmen é depositada diretamente no útero da fêmea. Entre 15 e 30 minutos após a inseminação forma-se um reservatório de espermatozóides na parte caudal do oviduto, onde os espermatozóides permanecem viáveis em até 44 horas após a inseminação, tornando-se hiperativos quando se aproxima o momento da ovulação (KEMP; SOEDE, 1997).

Estando neste reservatório, a liberação dos espermatozóides em direção ao oviduto é exponencial nas primeiras horas após a inseminação (STEVERINK et al., 1997) e a fertilização dos oócitos se dá na ampola do oviduto, onde sua chegada à região é auxiliada pelos batimentos rápidos dos cílios da superfície mucosa do oviduto (HAFEZ, 1995).

No útero, mais da metade dos espermatozóides perdem a motilidade entre 2 e 4 horas após a inseminação (FIRST et al., 1968).

Fêmeas cirurgicamente inseminadas na ponta da tuba intra-uterina, usando de 2 a 4 x 10⁵ espermatozóides vivos por oviduto, os índices de fertilidade e o tamanho da leitegada não diferiram dos resultados da IA convencional. No entanto, problemas com a técnica foram apontados, tais como alto risco de polispermia, menor seleção dos espermatozóides viáveis e menor influência do diluidor e do plasma seminal no oviduto, acarretando atraso na capacitação espermática (KRUEGER et al., 1999).

Na verificação do efeito do número de espermatozóides e volume da dose inseminante sobre a sobrevivência embrionária, observou-se que, tanto aos 3 dias após a inseminação, quanto aos 25 dias, o número de espermatozóides por dose ($2,5 \times 10^9$, $5,0 \times 10^9$ e

$10,0 \times 10^9$ espermatozóides por dose, diluídos cada um em 10, 20 e 50 mL de plasma seminal) não influenciou a sobrevivência embrionária, em que apenas o volume de 50 mL apresentou melhores índices. Provavelmente a razão da não influência do número de espermatozóides na sobrevivência embrionária prende-se às concentrações elevadas utilizadas (STRATMAN; SELF, 1960).

Quando a inseminação é realizada com sêmen congelado há redução drástica no intervalo ótimo de inseminação à ovulação, por este motivo o número de espermatozóides na dose inseminante deve ser muito maior.

Uma hipótese que tenta explicar estas afirmações é que a criopreservação aumenta a taxa de eliminação dos espermatozóides pelo trato reprodutivo da fêmea (KEMP; SOEDE, 1997) e embora o tempo de sobrevivência dos espermatozóides não se altere, há diminuição na probabilidade de fertilização por um único espermatozóide - de 5 a 6 vezes menor do que com sêmen fresco - ou alterações no padrão de sobrevivência dos espermatozóides.

Cogita-se, portanto, que isto ocorra devido à criopreservação causar morte espermática e os espermatozóides mortos liberem metabólitos tóxicos (H_2O_2), que acabam comprometendo a sobrevivência espermática (SHANON; VISHWANATH, 1995).

3.4 PROBLEMAS EM RELAÇÃO AOS ERROS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES NA DOSE INSEMINANTE

A seguir serão apresentadas as possíveis conseqüências da superestimação e da subestimação da concentração espermática de ejaculados de reprodutores suínos.

3.4.1 Problemas na superestimação da concentração espermática do ejaculado

A superestimação da concentração espermática leva a produção de doses reais com menor quantidade de espermatozóides e para que haja uma fertilização ótima, um número suficiente de espermatozóides deve estar presente no reservatório de sêmen que se forma na região caudal do istmo, denominada junção útero-tubárica.

Embora a dose inseminante contenha um número elevado de espermatozóides vivos (em média de 3 bilhões de sptz/dose), apenas algumas centenas de espermatozóides chegam ao local de fertilização.

Dessa maneira, muitos estudos foram realizados com a finalidade de avaliar o número de espermatozóides ideal nas doses inseminantes (BAKER et al., 1968; FIRST et al., 1968; KRUEGER et al., 1999; STEVERINK et al., 1997; STEVERINK et al., 1998; TARDIF et al., 1999; VIRING; EINARSSON, 1981).

3.4.2 Problemas na subestimação da concentração espermática do ejaculado

O aumento da concentração de espermatozóides na dose inseminante além da dose preconizada de $3,0 \times 10^9$ espermatozóides viáveis, não implica em melhora dos índices

reprodutivos, uma vez que o tempo de vida dos espermatozóides funcionais na região caudal do istmo não se altera com o aumento da dose inseminante.

As implicações decorrentes da dose inseminante com uma concentração de espermatozóides acima da ideal estão relacionadas, além dos aspectos do ponto de vista econômico, a possíveis falhas de manejo. Estas falhas podem ser mascaradas, já que um número muito alto de espermatozóides na dose inseminante pode compensar algum fator que está causando subfertilidade no cachaço, bem como diferenças no padrão de sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea (TARDIF et al., 1999).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos para a obtenção dos dados, denominados de *Experimento 1* e *Experimento 2*, descritos na seqüência.

4.1 LOCAL

Os experimentos 1 e 2 foram realizados em uma Central de Inseminação Artificial de Suínos (CIAS) da Suinocultura Rossetto, localizada no município de Cerqueira César, SP.

4.2 ANIMAIS E INSTALAÇÃO

Foram utilizados 51 machos reprodutores suínos de diferentes linhagens, os quais foram mantidos em baias individuais de cimento e com maravalha (Figura 1).

A técnica de colheita de sêmen foi a da “mão enluvada” (SHIPLEY, 1999), utilizando um copo térmico a 36 °C para acondicionar um Becker com marcação de volume. Tanto a fração rica em espermatozoides quanto a fração pobre foram colhidas para as análises.



Figura 1 – Cachaço em baia com maravalha

4.3 EXAME DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA DO EJACULADO

Em cada ejaculado colhido (Experimento 1 e 2) foi mensurada a concentração espermática pelas seguintes técnicas:

➤ **Câmara de Neubauer (CN)**

O sêmen foi colocado em uma solução fixadora de formol-salino numa diluição de 1:100 (0,1 mL de sêmen para 9,9 mL de solução fixadora) e, após a homogeneização, uma pequena quantidade dessa solução foi colocada nos locais indicados da câmara e realizou-se a contagem (Figura 2).

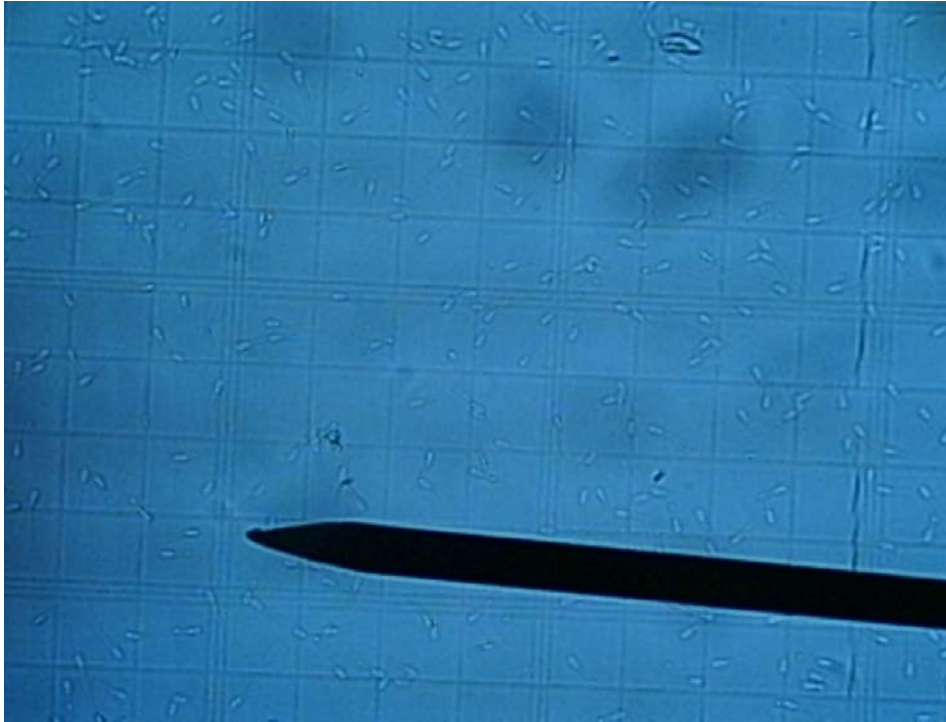


Figura 2 – Contagem dos espermatozóides na Câmara de Neubauer

Cada um dos campos de contagem possui 25 quadrados, sendo contados os espermatozóides que estão com a cabeça localizada no interior de 10 quadrados, sendo 5 em cada campo de contagem. A concentração foi obtida através do número de espermatozóides contados, a partir da fórmula: $\text{Concentração} = A \times 5 \times 100 \times 10 \times 1000$, onde **A** é a média do número de espermatozóides contados nos dois campos, **5** é fator necessário para completar os 25 quadrados de cada campo ou 1mm^2 , **100** é fator de diluição para completar 1mm^3 , **10** é o fator de profundidade da câmara e **1000** equivale à transformação para mL.

➤ **Espermiodensímetro (ESPM)**

O sêmen não diluído foi colocado em solução salina (NaCl) 0,9%, na proporção de 1:9. Após homogeneização, colocou-se o densímetro à frente de um fundo branco e observou-

se na escala do aparelho o ponto em que a visão do número deixa de ser nítida (Figura 3), definindo o valor do Espermiométrico. Na tabela que acompanha o aparelho (Tabela 1), fez-se a leitura da densidade correspondente a este valor.

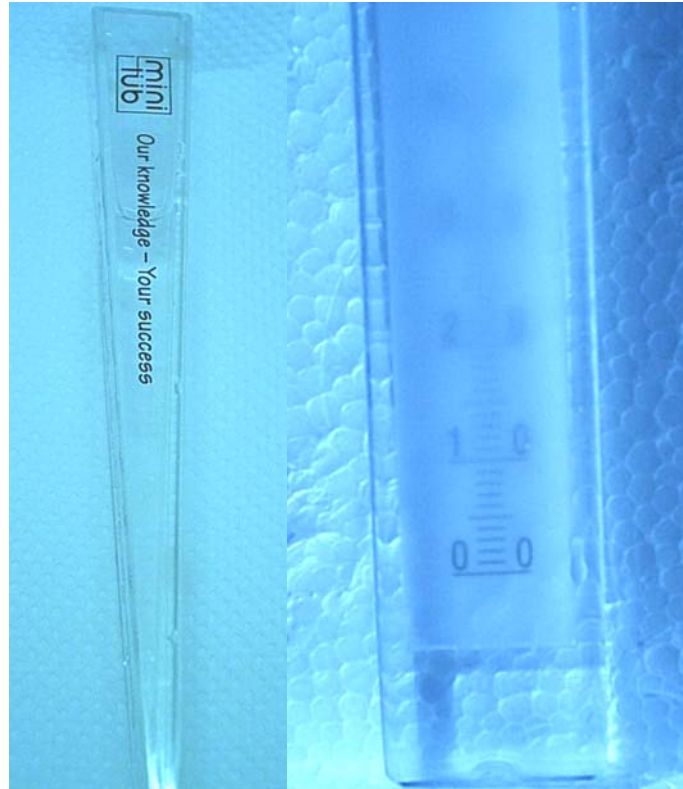


Figura 3 – Espermiométrico de Karras

Tabela 1 – Tabela do Espermiométrico de Karras – São Paulo – 2006

Valor Espermiométrico	Concentração espermática (10 ⁶ /mL)
95	135
90	150
85	165
80	180
75	195
70	210
65	225
60	245
55	265
50	295
45	335
40	375
35	425
30	485
25	555
20	635

➤ Espectrofotômetro

Foi utilizado um aparelho de espectrofotometria (Micronal B340Nm, 540 nm, figura 4), onde foi adicionado 0,3 mL de sêmen a 7,2 mL de diluidor de sêmen (Prolimax®, Vetlife Ltda, Brasil), sendo a leitura efetuada no visor do aparelho. A tabela utilizada para a determinação da concentração espermática foi a mesma em uso na CIA (Tabela 2), calibrada para o aparelho utilizando os animais da própria granja.



Figura 4 – Espectrofotômetro utilizado

Tabela 2 – Tabela do Espectrofotômetro – São Paulo – 2006

Valor Espectrofotômetro	Concentração espermática ($10^6/\text{mL}$)
0,050 – 0,080	40
0,081 - 0,130	70
0,131 - 0,180	110
0,181 - 0,230	140
0,231 - 0,280	170
0,281 - 0,330	210
0,331 - 0,380	240
0,381 - 0,430	280
0,431 - 0,480	320
0,481 - 0,530	350
0,531 - 0,580	380
0,581 - 0,630	420
0,631 - 0,680	450
0,681 - 0,730	480
0,731 - 0,780	520
0,781 - 0,830	560
0,831 - 0,880	590
0,881 - 0,930	630
0,931 - 0,980	660

4.4 EXPERIMENTO 1

Um total de 141 ejaculados de 51 cachacos foi utilizado para avaliação da Câmara de Neubauer, Espectrofotômetro e Espermiométrico.

As medições na Câmara de Neubauer e no Espectrofotômetro foram realizadas utilizando sempre o mesmo aparelho e técnico. Para o Espermiométrico foram realizadas medições da concentração espermática utilizando dois técnicos diferentes.

Foram colhidas também, informações adicionais do volume do ejaculado, temperatura após colheita, linhagem e idade do cachaco.

A figura 5 mostra esquematicamente o delineamento do Experimento 1.

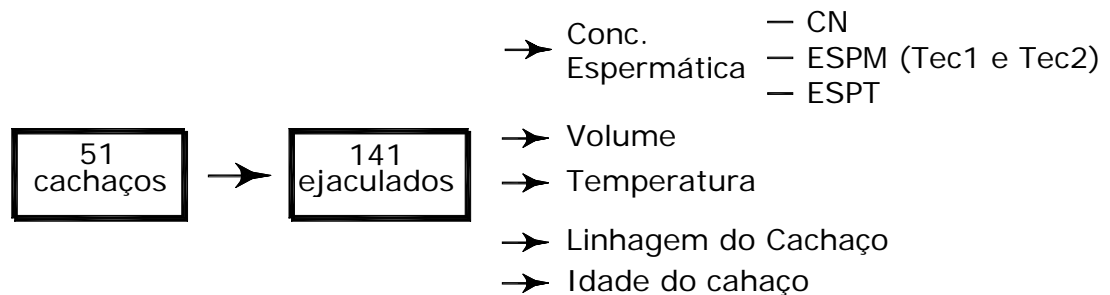


Figura 5 – Diagrama do Delineamento do Experimento 1

As variáveis envolvidas no 1º experimento foram:

- **Idade** – Idade do cachaco no dia de mensuração (*em dias*);
- **Linhagem** – Linhagem do cachaco (em 5 níveis – *Agrocères-PIC 1075, Agrocères-PIC 337, Agrocères-PIC 412, Agrocères-PIC 419 e Tibor Dalland*);

- **ConcESPM1** – Concentração espermática avaliada por meio do espermiodensímetro e Técnico 1 (*em 9 níveis - 120, 150, 180, 210, 245, 295, 375, 485 e 635 $\times 10^6$ sptz/mL*);
- **ConcESPM2** – Concentração espermática avaliada por meio do espermiodensímetro e Técnico 2 (*em 9 níveis - 120, 150, 180, 210, 245, 295, 375, 485 e 635 $\times 10^6$ sptz/mL*);
- **ConcESPT** – Concentração espermática avaliada por meio do espectrofotômetro (*em 12 níveis -70, 110, 140, 170, 210, 240, 280, 320, 350, 380 e 450 $\times 10^6$ sptz/mL*);
- **ConcCN** – Concentração espermática avaliada por meio da câmara de Neubauer (*$\times 10^6$ sptz/mL*);
- **Vol** – Volume do ejaculado (*em mL*).

4.5 EXPERIMENTO 2

Foram colhidos 53 ejaculados de 40 cachacos no experimento 2. No entanto, apenas 42 ejaculados foram utilizados para a avaliação da concentração espermática pelo Espectrofotômetro.

Para cada amostra de ejaculado foram realizadas 15 contagens da concentração de espermatozoides, 5 através do Espectrofotômetro, 5 do Espermiodensímetro e 5 através da Câmara de Neubauer.

Para cada amostra analisada o tempo foi cronometrado a partir da preparação de cada técnica. Ressalta-se que na CN apenas um campo foi cronometrado.

A figura 6 mostra esquematicamente o delineamento do Experimento 2.

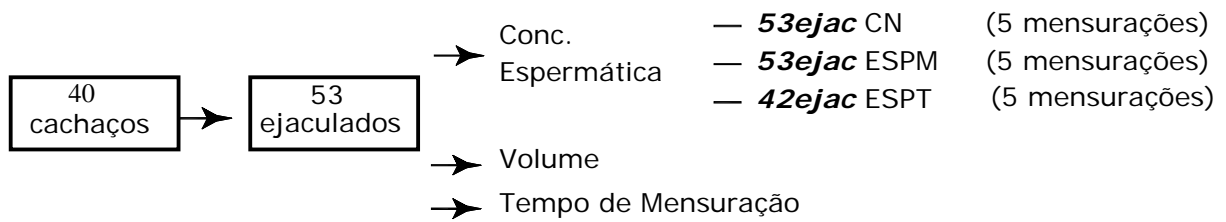


Figura 6 – Diagrama do Delineamento do Experimento 2

As variáveis envolvidas no 2º experimento foram:

- **ConcESPM** – Concentração espermática avaliada por meio do Espermiodensímetro (*em 9 níveis - 120, 150, 180, 210, 245, 295, 375, 485 e 635 $\times 10^6$ sptz/mL*);
- **ConcESPT** – Concentração espermática avaliada por meio do Espectrofotômetro (*em 12 níveis - 70, 110, 140, 170, 210, 240, 280, 320, 350, 380 e 450 $\times 10^6$ sptz/mL*);
- **ConcCN** – Concentração espermática avaliada por meio da Câmara de Neubauer (*$\times 10^6$ sptz/mL*);
- **TESPM** – Tempo gasto nas 5 mensurações do Espermiodensímetro (*em s*);
- **TESPT** – Tempo gasto nas 5 mensurações do Espectrofotômetro (*em s*);
- **TCN** – Tempo gasto nas 5 mensurações da Câmara de Neubauer (*em s*);
- **Vol** – Volume do ejaculado (*em mL*);

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análises estatísticas dos experimentos 1 e 2 estão descritas a seguir.

4.6.1 Experimento 1

A técnica da Câmara de Neubauer foi definida como técnica padrão para o estudo comparativo da concentração espermática com técnicas alternativas como o ESPT e ESPM.

A acurácia dessas técnicas alternativas foi calculada através da média do viés, obtida pela diferença entre a concentração da técnica alternativa e a concentração da técnica padrão.

Ressalta-se que quanto mais próximo de zero é o viés, mais acurado é o teste em relação à CN.

A precisão de cada técnica em relação à CN foi determinada através do desvio padrão dos vieses entre a técnica alternativa e a técnica padrão, ou seja, quanto menor o desvio padrão, mais preciso é o teste.

Foi testada a Robustez do Espermiométrico e do Espectrofotômetro em função do volume de cada ejaculado, realizando-se uma análise de regressão simples das variáveis dependentes, viés do ESPT e ESPM em relação à técnica padrão, em função do volume do ejaculado.

Para comparar a precisão de ESPT e ESPM foi utilizado o teste de Bartlett de homogeneidade das variâncias.

Já as acurácias entre as técnicas alternativas foram comparadas empregando-se a análise de variância com os dados dos vieses entre a técnica alternativa e a padrão.

Adicionalmente, o teste T foi utilizado para comparação do viés médio de cada técnica com o valor zero. Neste caso, resultado significativo indica falta de acurácia da técnica.

A elaboração da nova tabela ajustada do Espermiodensímetro e do Espectrofotômetro foi realizada através de análise de regressão linear simples, utilizando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ik} = \mu_i + \varepsilon_{ik}$$

$$\mu_i = a + bc_i$$

$$\varepsilon_{ik} \sim N(0, (k_1 + c_i k_2)^2) \text{ independentes.}$$

c_i - concentração na i-ésima categoria;

Y_{ik} - Concentração da CN mensurada na k-ésima observação da i-ésima categoria;

μ_i - Valor esperado de Y_{ik} , quando a concentração ESPM é c_i ;

ε_{ik} - Efeito aleatório ocorrido na k-ésima observação da i-ésima categoria;

a,b - Parâmetros da variação linear da média da CN em relação à c_i ;

k_1, k_2 - Parâmetros da variação linear do desvio padrão da CN em relação à c_i ;

4.6.2 Experimento 2

As variáveis tempo gasto em cada técnica e variabilidade das técnicas foram apresentadas sob a forma de média \pm erro padrão da média, sendo verificadas a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett.

Para as variáveis que obedeceram estas premissas foram realizadas análises de variância e teste de Tukey de comparação de médias, e para as variáveis que não obedecerem estas premissas foi utilizado teste não-paramétrico (NPAR1WAY), do pacote estatístico SAS (SAS, 1985).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados dos experimentos 1 e 2 estão descritos a seguir.

5.1 EXPERIMENTO 1

Os resultados descritivos das técnicas no Experimento 1 encontram-se na tabela 3.

O Espectrofotômetro apresentou valores inferiores aos verificados na Câmara de Neubauer, havendo uma subestimação da concentração espermática, quando comparada com a técnica padrão.

O Espermiodensímetro, por outro lado, revelou valores superiores aos da Câmara de Neubauer, demonstrando uma tendência da técnica em superestimar a concentração espermática.

Tabela 3 – Resultados descritivos das técnicas de mensuração da concentração espermática – São Paulo – 2006

Técnica	N	Média Concentração (10 ⁶ sptz/mL)	Desvio Padrão	Número médio de doses ¹
Câmara de Neubauer	141	229,1	102,5	22,6
Espectrofotômetro	141	185,0	68,2	18,5
Espermiodensímetro	141	283,6	106,0	28,0

¹ concentração espermática x volume / 3000 (sem considerar a motilidade; dose fixa em 3 bilhões de sptz)

Considerando a CN como mensuração padrão da concentração espermática, podemos obter a quantidade de espermatozoides dos ejaculados, prever o número de doses e o número de espermatozoides por dose.

Pelas medidas descritivas das tabelas 3 e 4 e figuras 7, 8, 9 e 10, verifica-se que devido à superestimação da concentração espermática pelo ESPM, obtém-se em média 28 doses, contendo $2,42 \times 10^9$ espermatozoides por dose, contra 22,6 doses obtida pela CN (redução de $0,58 \times 10^9$ espermatozoides por dose para ESPM). O volume médio dos 141 ejaculados do experimento 1 foi de 312,6 mL.

Observou-se que aproximadamente 90% das doses contêm um número menor que os 3×10^9 espermatozoides necessários para uma inseminação com segurança.

Na subestimação do ESPT obtém-se, em média, $3,66 \times 10^9$ espermatozoides por dose.

Aproximadamente 76% das doses tem quantidade superior a 3×10^9 espermatozoides, sendo obtidas 18,5 doses por ejaculado, perda de 4,1 doses em comparação ao número de doses obtido pela estimativa da concentração espermática realizada através da CN.

Tabela 4 – Estatísticas do Número de espermatozoides por dose ($N^{\circ}\text{Esp} \times 10^6$) em relação à Câmara de Neubauer – São Paulo – 2006

Método	N	Média ($\times 10^6$)	DP ($\times 10^6$)	Mín. ($\times 10^6$)	Q1 ($\times 10^6$)	Q3 ($\times 10^6$)	Máx. ($\times 10^6$)
ESPM	141	2.421,4	469,0	1.062,5	2.050,5	2.710,2	3.527,5
ESPT	141	3.664,8	782,4	2.142,9	3.151,8	4.168,8	6.000,0

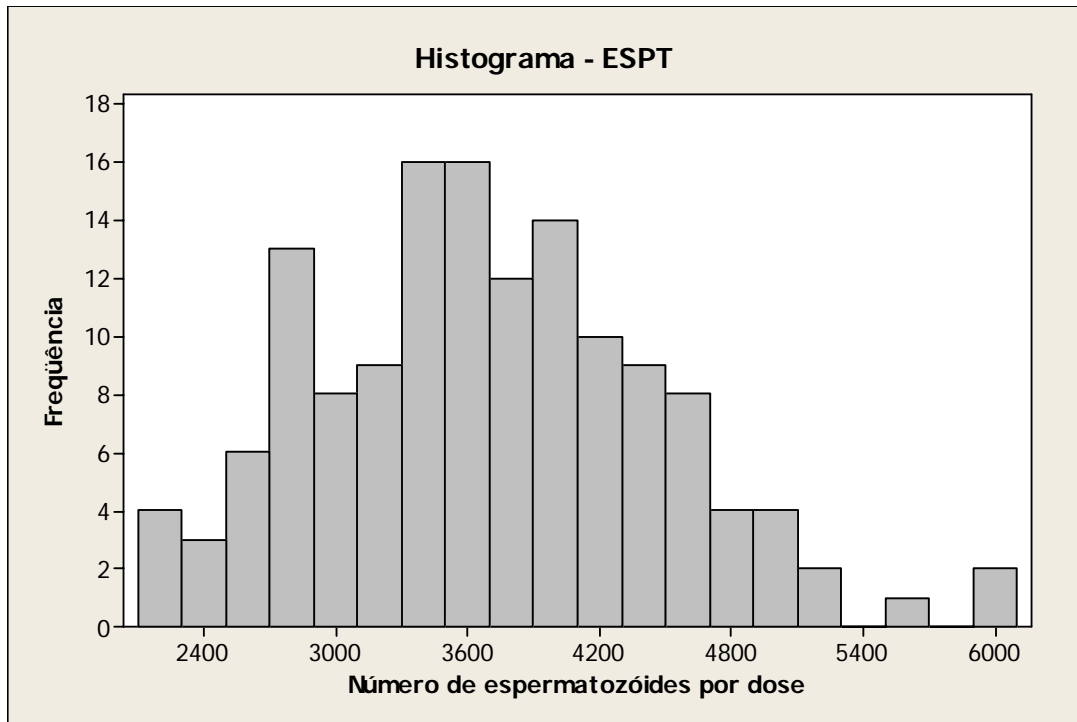


Figura 7 – Histograma da distribuição do número de espermatozoides por dose ($\times 10^6$) – ESPT

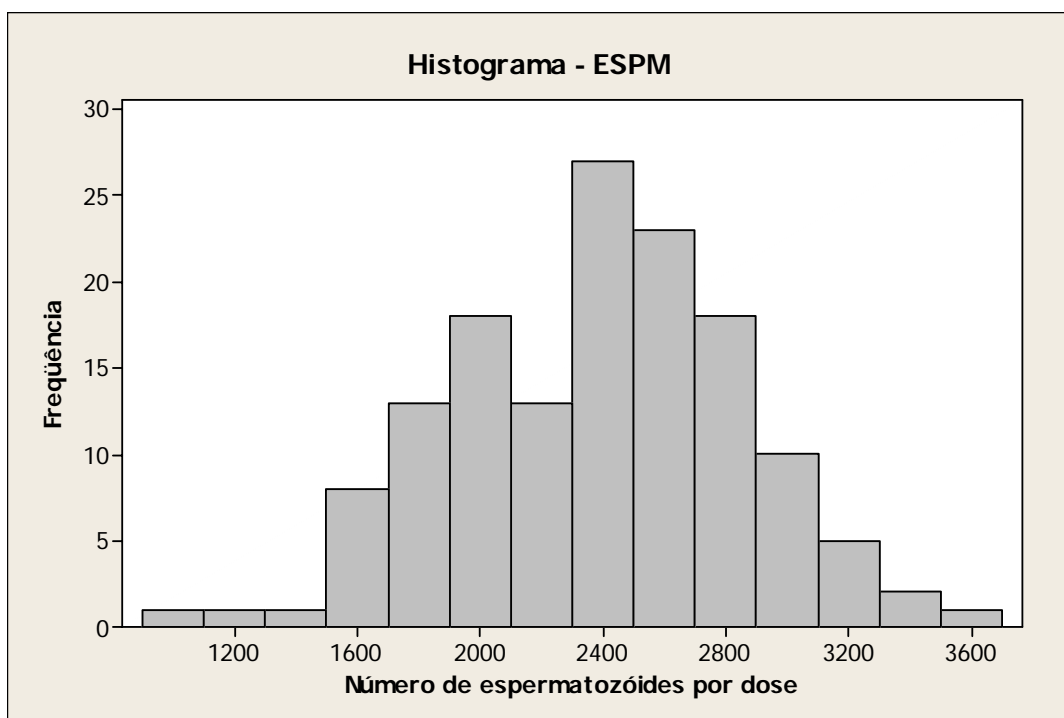


Figura 8 – Histograma da distribuição do número de espermatozoides por dose ($\times 10^6$) – ESPM

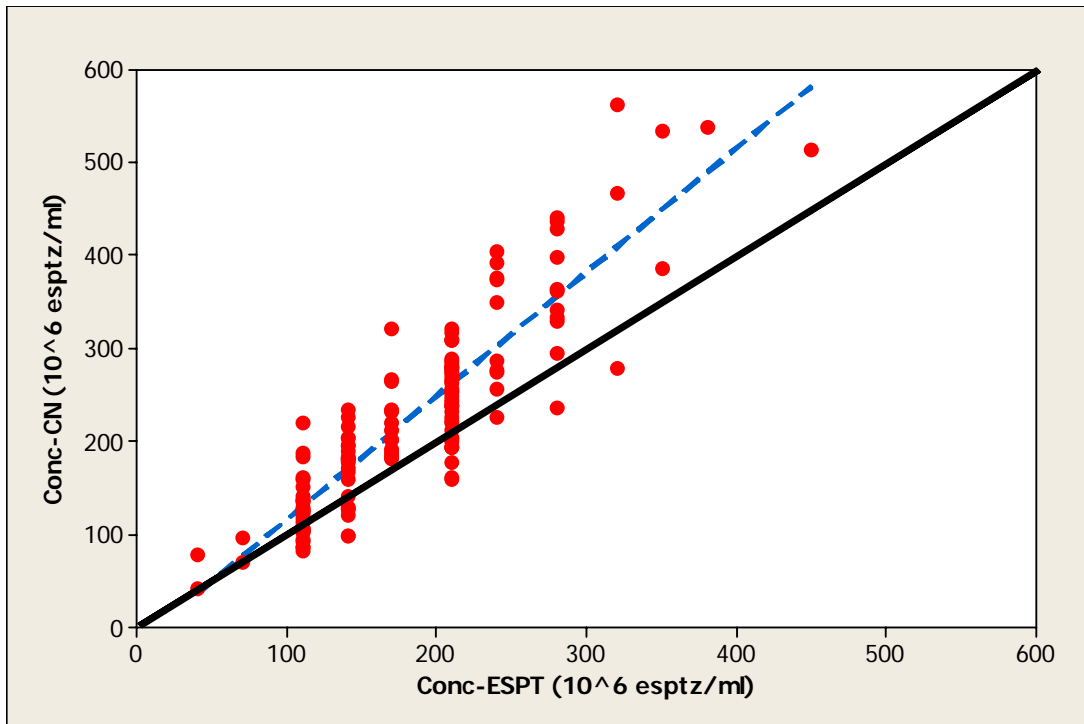


Figura 9 – Gráfico de dispersão da concentração pelo ESPT x concentração pela Câmara de Neubauer com ajuste da regressão linear

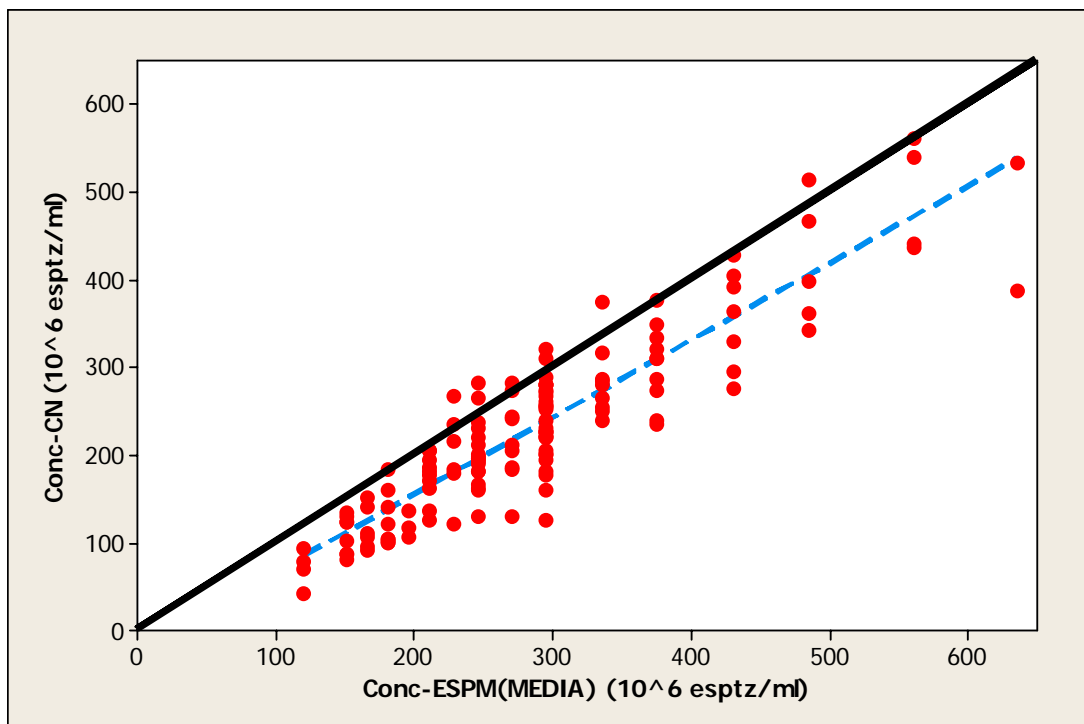


Figura 10 – Gráfico de dispersão da concentração pelo ESPM x concentração pela Câmara de Neubauer com ajuste da regressão linear

Os resultados de viés médio, indicadores de acurácia, e desvio padrão do viés, indicadores de precisão, para o Espermiométrico e Espectrofotômetro estão descritos na tabela 5.

Nota-se novamente a habilidade do Espectrofotômetro em subestimar e do Espermiométrico em superestimar a concentração espermática, em comparação à Câmara de Neubauer.

Quanto ao viés médio, o Espectrofotômetro foi mais próximo de zero, ou seja, em média o Espectrofotômetro tendeu a ser mais acurado que o Espermiométrico.

Com relação à precisão, não foi possível mostrar diferença no desvio padrão do viés através do teste de homogeneidade das variâncias, indicando precisão semelhante entre as técnicas.

Tabela 5 – Acurácia e Precisão do Espermiométrico e Espectrofotômetro – São Paulo – 2006

Técnica	Viés médio (Acurácia) ¹	Desvio Padrão do Viés (Precisão)
Espectrofotômetro	-44,1 ^b	52,6 ^a
Espermiométrico	54,5 ^a	44,8 ^a

Colunas com letras sobscritas distintas diferem entre si ($P < 0,0001$). ¹ Diferem de zero ($P < 0,0001$) pelo Teste T.

As robustezes para volume do ejaculado, avaliadas por meio do Espectrofotômetro e do Espermiométrico, estão demonstradas nas figuras 11 e 12.

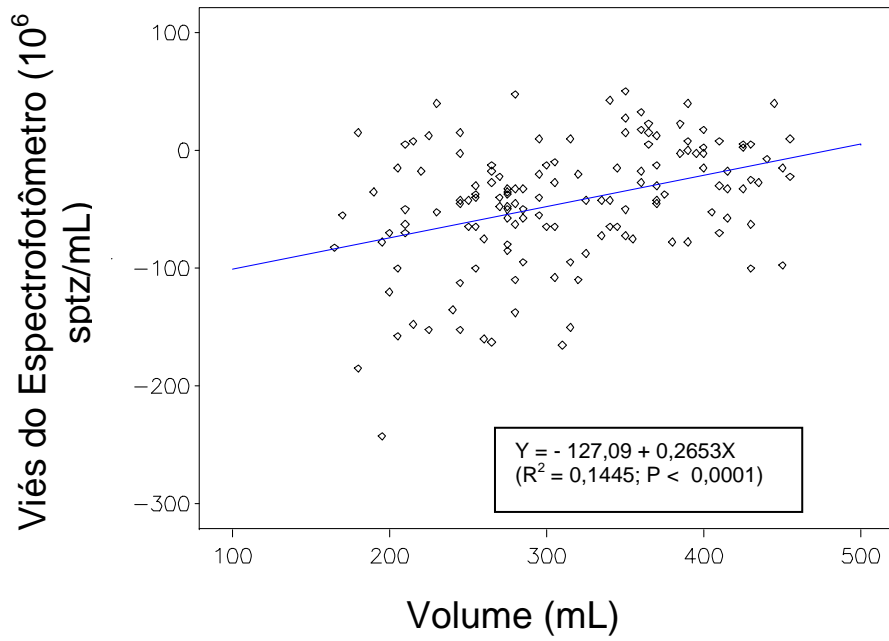


Figura 11 – Robustez do Espectrofotômetro

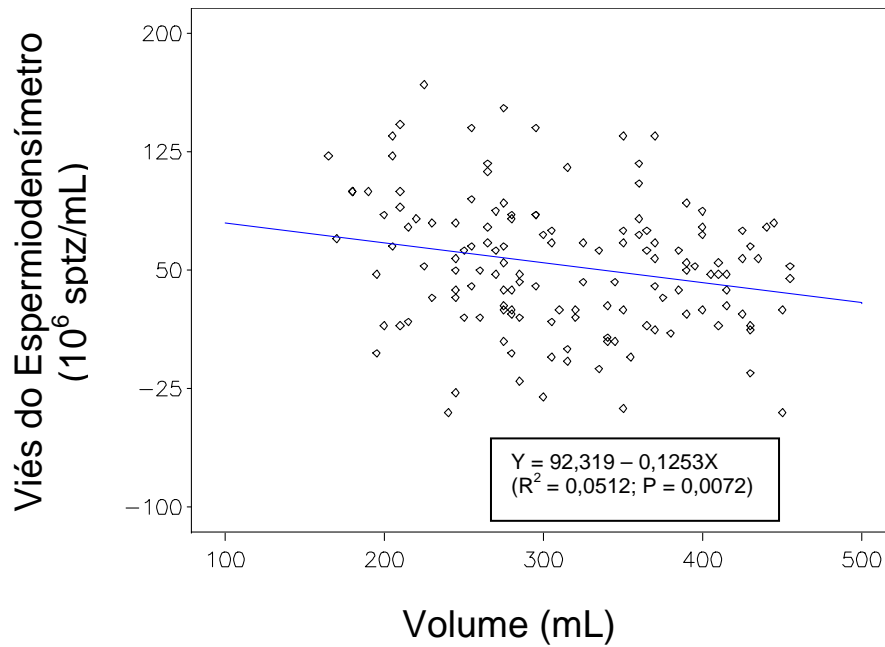


Figura 12 – Robustez do Espermioidensímetro

Pode-se verificar através das figuras 11 e 12 que o volume do ejaculado exerceu pequeno efeito sobre o viés, tanto do ESPT como do ESPM.

Portanto, pelos baixos coeficientes de determinação da regressão (R^2), existe pouca indicação de que quanto maior o volume do ejaculado, maior será a acurácia dos testes em relação à Câmara de Neubauer.

Sobre uma possível relação entre concentração espermática pela CN e idade do cachaco, observa-se na figura 13, que não existe relação entre essas duas variáveis.

As figuras 14 e 15 investigam a relação entre os resíduos dos ajustes lineares dos métodos ESPT e ESPM em relação à CN e às idades dos cachacos, onde também não há indicações de existência de relação linear.

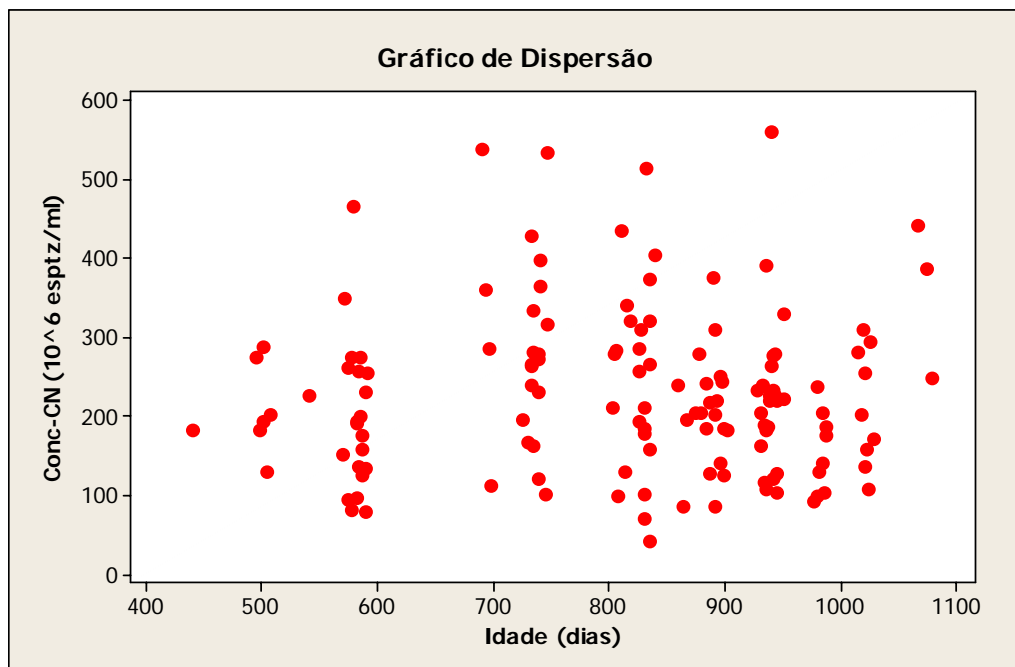


Figura 13 – Gráfico de dispersão da concentração espermática pela Câmara de Neubauer x *Idade*

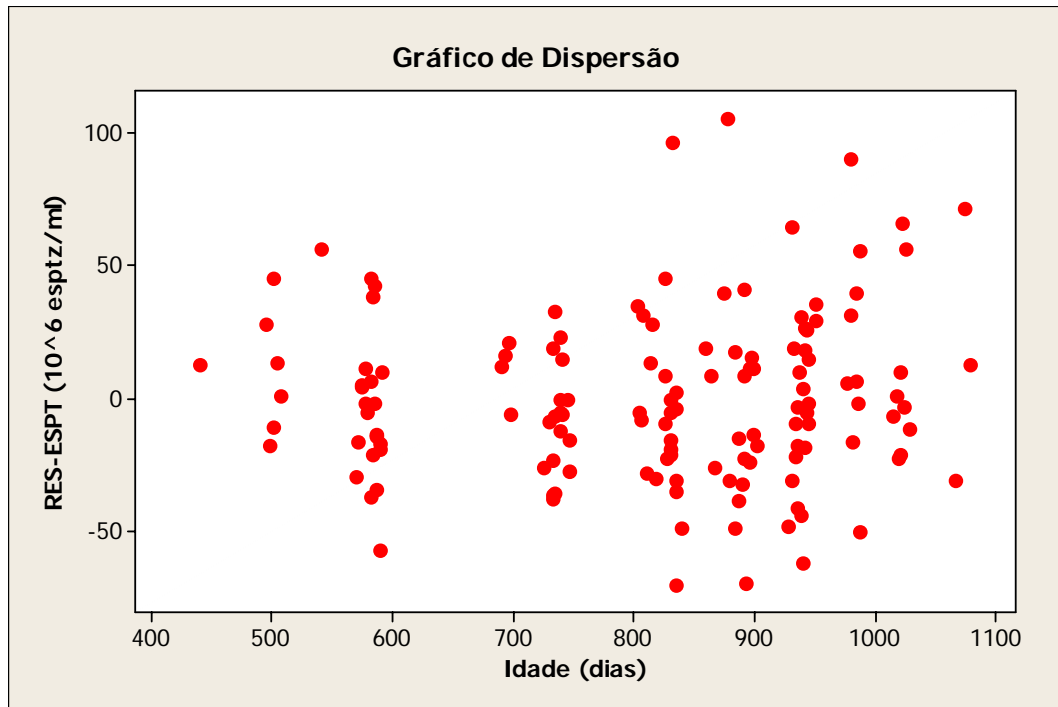


Figura 14 – Gráfico de dispersão de Resíduo do ESPT em relação à CN x *Idade*

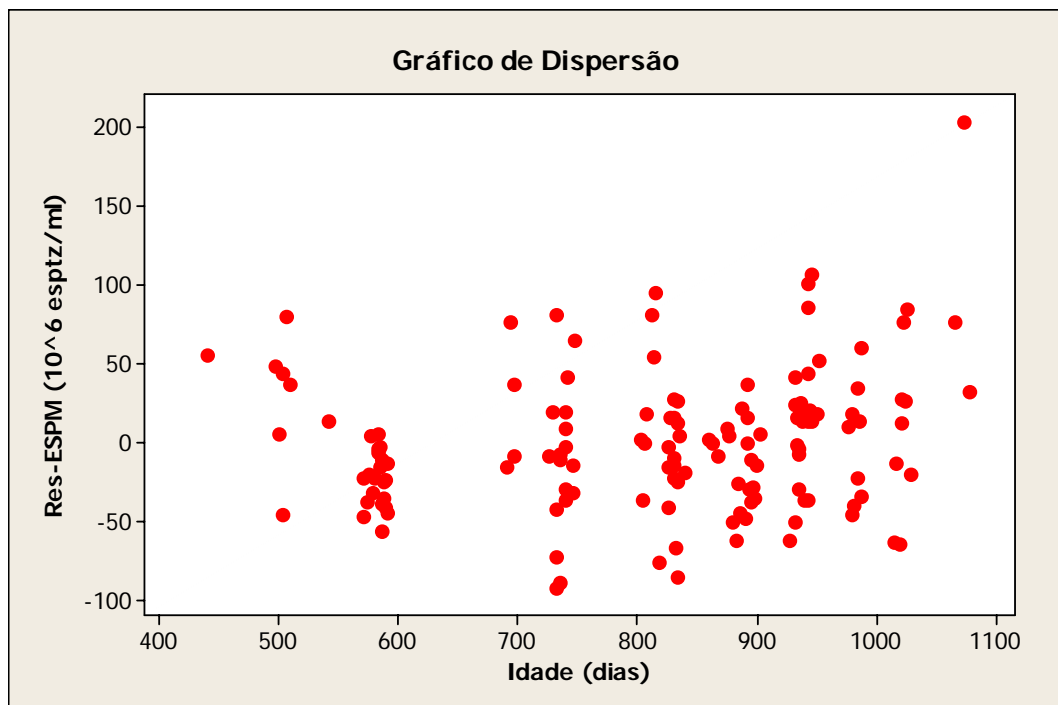


Figura 15 – Gráfico de dispersão de Resíduo do ESPM em relação à CN x *Idade*

A figura 16 mostra o histograma da distribuição da diferença entre as medidas de concentração espermática realizada pelos técnicos 1 e 2 através do ESPM no Experimento 1.

Observa-se que em 97 das 141 mensurações houve concordância entre os dois técnicos.

Nota-se também que a distribuição é simétrica em relação à origem, sugerindo que, em média, um técnico não tem medidas superiores ou inferiores às medidas do outro técnico.

Entretanto, o gráfico de dispersão desta diferença pela *Concentração espermática da Câmara de Neubauer*, figura 17, indica que, quanto maior a concentração espermática, maior é a divergência entre as medidas dos dois técnicos, ou seja, a concordância entre os técnicos poderia depender da concentração espermática.

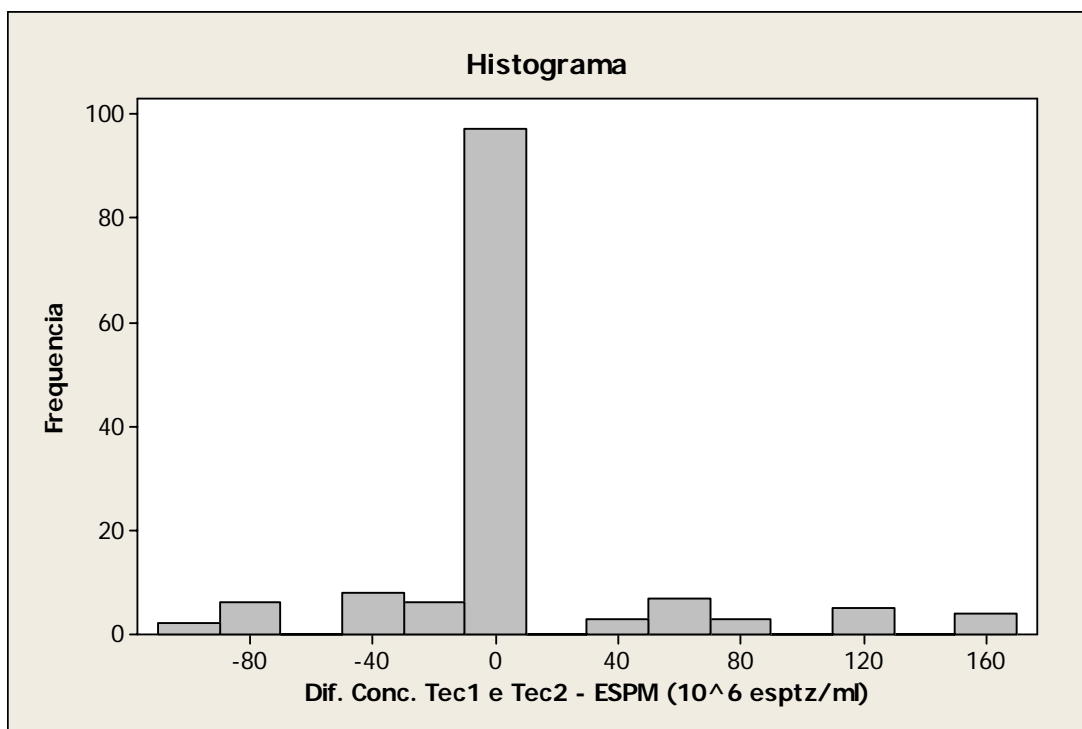


Figura 16 – Histograma da distribuição da diferença entre as medidas de concentração dos técnicos 1 e 2 do método ESPM

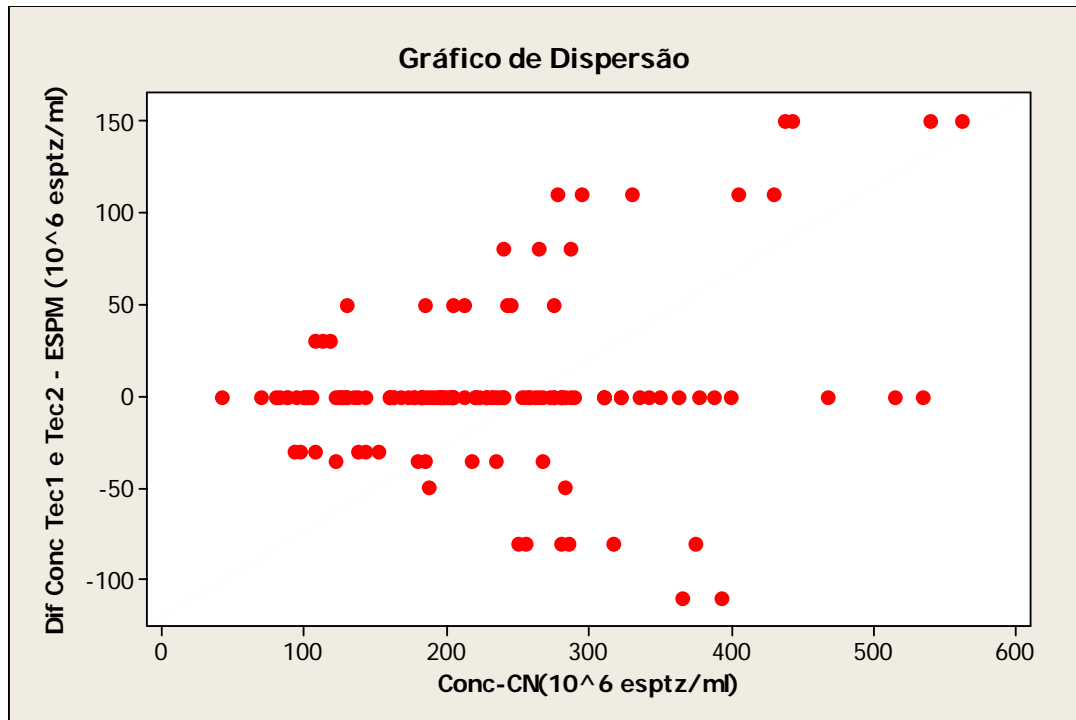


Figura 17 – Gráfico de dispersão da distribuição da diferença entre as medidas de concentração espermática pelo ESPM dos Técnicos 1 e 2 em função da Concentração espermática pela Câmara de Neubauer

As mensurações realizadas pelos técnicos 1 e 2 através do ESPM concentraram-se nas 9 categorias ordinais (120,150, 180, 210, 245, 295, 375, 485 e 635). A tabela 6 contém um resumo das observações.

As caselas em negrito referem-se às medições concordantes entre os técnicos, as caselas acima, referem-se às medições em que o Técnico 2 obteve resultado superior ao do Técnico 1. Referiremos esse tipo de discordância como positiva (Técnico 2 maior que Técnico 1) e discordância negativa caso a medição do Técnico 2 seja inferior.

Tabela 6 – Contagem das duplas de mensuração dos Técnicos 1 e 2 – São Paulo – 2006

		Técnico 2								Total	
		120	150	180	210	245	295	375	485		635
Técnico 1	120	4									4
	150		8	5							13
	180		1	9	1						11
	210			2	10	6					18
	245					19	2				21
	295					7	30	6			43
	375						3	10	2		15
	485							5	5		10
	635								4	2	6
Total	4	9	16	11	32	35	21	11	2	141	

Nota-se que, de acordo com a ordenação da escala de mensuração, a discordância entre as medições dos dois técnicos é de apenas uma categoria.

Deste modo, foi analisado se os padrões de concordância, discordância positiva e discordância negativa se mantêm constantes em todas as categorias de mensuração do Técnico 2.

Caso esses padrões se modifiquem, há indicação de que a concentração espermática tem influência sobre a concordância entre os técnicos.

Como, por construção, as categorias 120 e 635 não possuem discordâncias negativa ou positiva, respectivamente, estas não entraram na análise. Devido ao pequeno número de dados, as categorias vizinhas foram agrupadas de maneira a obter no total 4 categorias (150-180, 210-245, 295-375, 485), tabela 7.

Tabela 7 – Tabela de contingência entre as variáveis Tipo de Discordância e Categoria de Mensuração – São Paulo – 2006

		Categoria de Mensuração			
		150-180	210-245	295-375	485
Tipo de Discordância	Discordância				
	Positiva	5	7	8	2
	Concordância	17	29	40	5
	Discordância				
	Negativa	3	7	8	4

Através de um teste χ^2 de homogeneidade (BUSSAB; MORETTIN, 2002) obteve-se um nível descritivo de 0,618.

Ao considerar um nível de significância de 5% não rejeita-se a hipótese de homogeneidade das frequências dos tipos de discordância entre as categorias de mensuração, ou seja, que o padrão de discordância de medições entre os técnicos não é alterado com a concentração espermática.

Em seguida, na tabela 8, foram estimadas as proporções dos tipos de concordância com um intervalo de confiança de 95%.

Em 69% das mensurações os dois técnicos obtiveram exatamente a mesma mensuração, não existindo diferença entre as proporções de discordância positiva e negativa.

Tabela 8 – Estimativa das Proporções dos Tipos de Concordância – São Paulo – 2006

	Proporção		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
Discordância Positiva	0,156	0,103	0,222
Concordância	0,688	0,609	0,760
Discordância Negativa	0,156	0,103	0,222

5.2 EXPERIMENTO 2

Na tabela 9 são apresentados os valores de tempo gasto e do coeficiente de variação ou repetibilidade de cada técnica de mensuração da concentração espermática.

Pode-se observar que o tempo gasto pelo ESPM foi significativamente menor que o ESPT e CN ($P < 0,0001$).

A diferença de tempo do ESPM e do ESPT em relação à CN pode ser ainda maior, considerando os dois campos de contagem da CN.

O ESPT apresentou valor significativamente superior ao ESPM ($P < 0,0001$), auxiliado pelo tempo gasto durante a calibração do aparelho, já que a cada análise de sêmen é necessário realizar o seu ajuste.

Em relação à repetibilidade de cada técnica, medida através do coeficiente de variação, nota-se que o ESPM foi a técnica de menor variabilidade (0 %), seguido pelo ESPT (3,77 %) e por último pela CN (5,29 %).

Embora não tenham sido encontrados dados na literatura que comparassem estas técnicas especificamente, foi demonstrada alta variabilidade da CN em relação às outras técnicas utilizadas no presente estudo.

Tabela 9 – Comparação do tempo e coeficiente de variação (repetibilidade) do Espermiodensímetro, Espectrofotômetro e Câmara de Neubauer – São Paulo – 2006

Variáveis*	N	Espermiodensímetro Média±DP	Espectrofotômetro Média±DP	Câmara de Neubauer Média±DP
Tempo (s)	42	21,16±2,76 ^C	32,61±2,76 ^B	129,69±31,72 ^A
Coeficiente de variação (%)	42	0±0 ^C	3,77±4,68 ^B	5,29±2,52 ^A

* Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis.

^{A,B,C} Letras sobrescritas distintas, em uma mesma linha, diferem entre si (P<0,05).

5.3 CORREÇÃO DE ESCALAS DO INSTRUMENTO ESPM

Foram utilizados os dados do Experimento 1 para estabelecer a correção de escala do ESPM.

Vale notar que as medidas em ESPM foram realizadas por dois técnicos e que foram utilizados somente as medidas do Técnico 1 para a correção da escala.

Esse procedimento foi adotado devido à concordância nos padrões de erros dos dois técnicos, verificada anteriormente.

Como mostram as figuras 18 e 19, existe uma relação linear e um aumento da variabilidade da concentração espermática da CN com as categorias de ESPM.

O teste não paramétrico de Levene, aplicado para testar a hipótese de igualdade de variâncias da CN em cada um dos níveis do ESPM, não aceita a hipótese de homogeneidade de variâncias com um nível descritivo inferior a 0,001.

A tabela 10 contém as medidas descritivas da CN pelo ESPM.

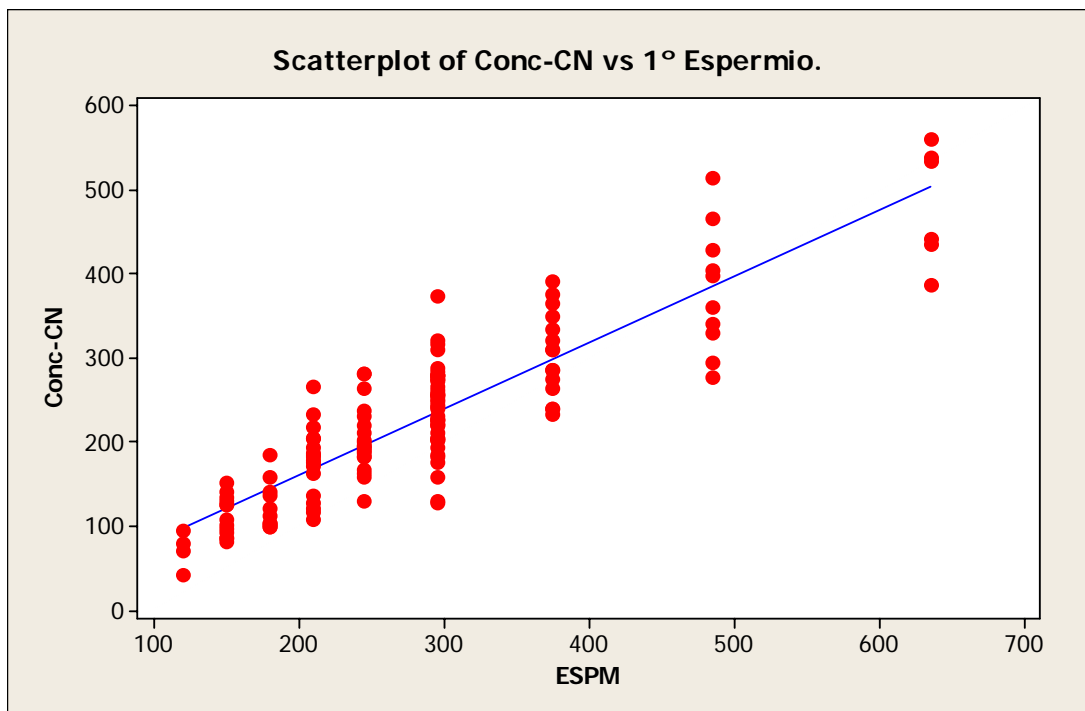


Figura 18 – Gráfico de dispersão da concentração espermática da CN (Conc-CN) x concentração espermática do ESPM (Conc-ESPM) no Experimento 1

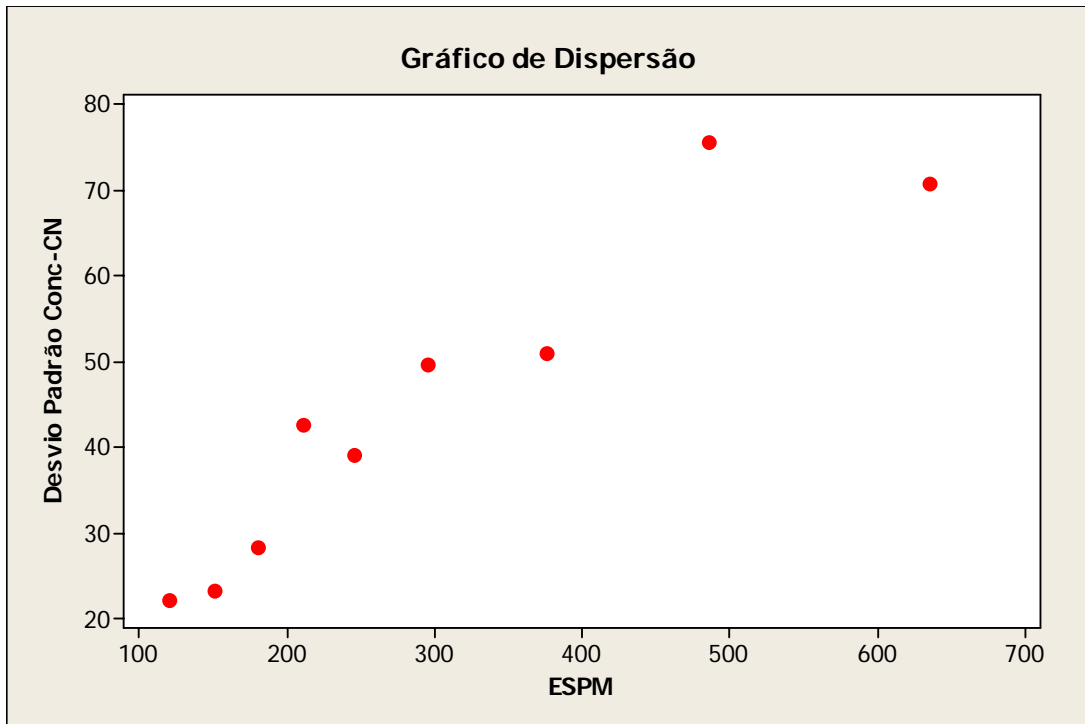


Figura 19 – Gráfico de dispersão do desvio padrão da concentração espermiática da CN (Conc-CN) x concentração espermiática do ESPM (Conc-ESPM) no Experimento 1

Tabela 10 – Estatísticas descritivas da concentração espermiática da CN nas categorias da concentração espermiática do ESPM – São Paulo – 2006

ESPM	N	Média	Desvio Padrão	Mín.	Q1	Mediana	Q3	Máx.
120	4	71,9	22,1	42,5	49,4	75	91,3	95
150	13	112,88	23,32	82,5	90	107,5	132,5	152,5
180	11	124,77	28,29	100	102,5	112,5	142,5	185
210	18	176,9	42,6	107,5	135	181,3	205	267,5
245	21	203,81	39,04	130	182,5	197,5	226,25	282,5
295	43	241,63	49,75	127,5	205	245	275	375
375	15	306,2	50,9	235	265	310	350	392,5
485	10	382,5	75,5	277,5	321,3	381,3	439,4	515
635	6	484,2	70,8	387,5	425	488,8	545,6	562,5

A variabilidade da medição pela CN aumenta à medida que a concentração medida pela técnica ESPM aumenta. Os estimadores de mínimos quadrados generalizados estimam as retas de regressão por:

$$DP(c_i) = 13,60 + 0,11.c_i$$

$$ConcCN = -12,8 + 0,85.ConcESPM ;$$

Nas equações acima, os valores possíveis para a concentração do ESPM abrangem as categorias consideradas no experimento (especificadas na tabela 10).

Na tabela 11 são apresentadas as estimativas aproximadas da concentração espermática da CN para cada uma das categorias da concentração espermática de ESPM com confiança de 95%.

Dessa maneira, foi estabelecida uma “Tabela Ajustada para o Espermiométrico LPS-FMVZ-USP”, conforme mostra a tabela 12.

Tabela 11 – Tabela de calibração da concentração espermática da CN para cada uma das categorias da concentração espermática de ESPM – São Paulo – 2006

Cat.	Estimativa da Média				Previsão		
	Estimativa	Lim. Inf.	Lim.Sup.	Intervalo	Lim. Inf.	Lim.Sup.	Intervalo
120	89,20	70,55	89,07	18,52	25,29	134,34	109,05
150	114,70	97,73	113,43	15,70	44,71	166,44	121,72
180	140,20	124,51	138,17	13,66	64,01	198,67	134,65
210	165,70	150,72	163,49	12,77	83,22	230,99	147,77
245	195,45	180,43	193,90	13,48	105,54	268,79	163,24
295	237,95	221,53	238,68	17,16	137,31	322,90	185,59
375	305,95	285,72	311,90	26,18	187,95	409,67	221,72
485	399,45	372,98	413,57	40,58	257,34	529,21	271,87
635	526,95	491,48	552,71	61,22	351,73	692,46	340,73

Tabela 12 – Tabela de Karras e Tabela Ajustada LPS-FMVZ-USP (Concentração pela CN = $-12,80 + 0,85 \cdot \text{Concentração pela tabela de Karras}$) – São Paulo – 2006

Resultado do Espermiodensímetro	Concentração pela Tabela de Karras ($10^6/\text{mL}$)	Concentração pela Tabela Ajustada-LPS/USP ($10^6/\text{mL}$)
95	135	101,95
90	150	114,70
85	165	127,45
80	180	140,20
75	195	152,95
70	210	165,70
65	225	178,45
60	245	195,45
55	265	212,45
50	295	237,95
45	335	271,95
40	375	305,95
35	425	348,45
30	485	399,45
25	555	458,95
20	635	526,95

As suposições de normalidade dos resíduos e linearidade são respeitadas, como mostra a figura 20.

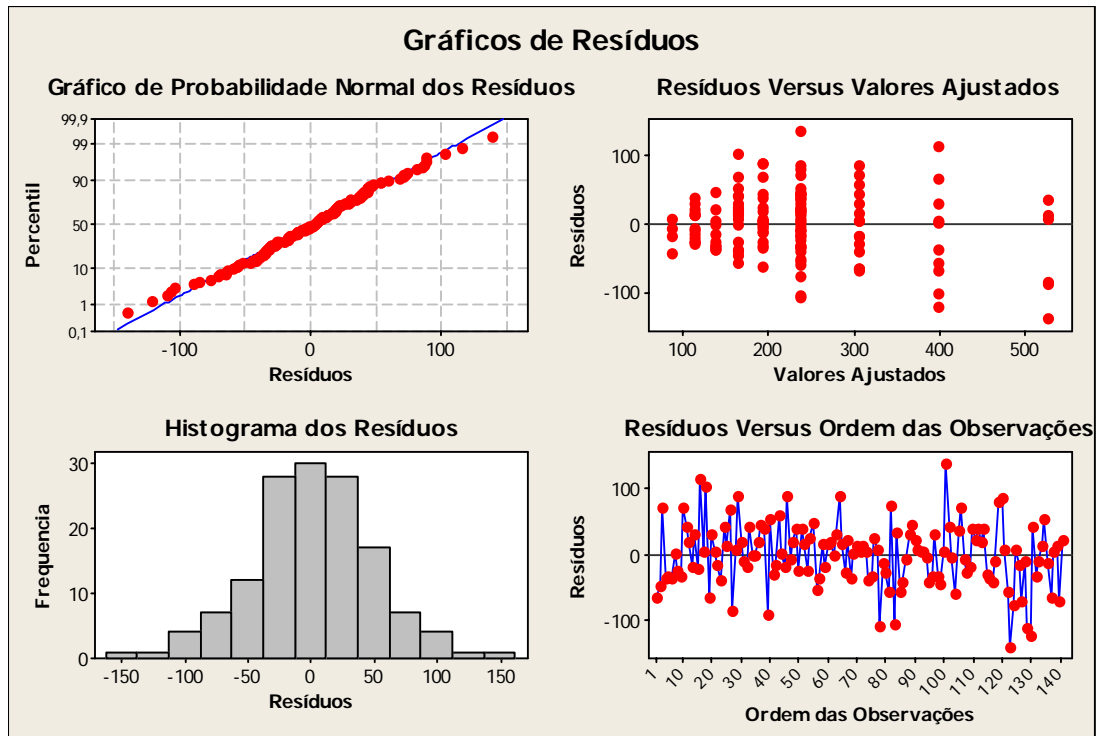


Figura 20 - Análise de resíduos do ajuste do modelo em ESPM

A análise do ajuste do modelo acima para os dados do Experimento 2, através das figuras 21 e 22, mostra que foi respeitada a relação linear da concentração espermática da CN e ESPM.

Considerado-se um nível de significância de 5%, ao ser testada a hipótese nula de média dos resíduos igual a zero *versus* diferente de zero em cada uma das categorias de ESPM, constata-se a aceitação da hipótese nula, com um nível descritivo superior a 0,24 em todas as categorias, exceto na categoria 180 que teve um nível descritivo de 0,03.

No entanto, vale ressaltar que tal nível descritivo não está demasiadamente distante do usual (0,05) e que utilizando o método de Bonferroni com coeficiente global de 95% para os 6 testes, aceitamos as hipóteses de médias zero simultaneamente.

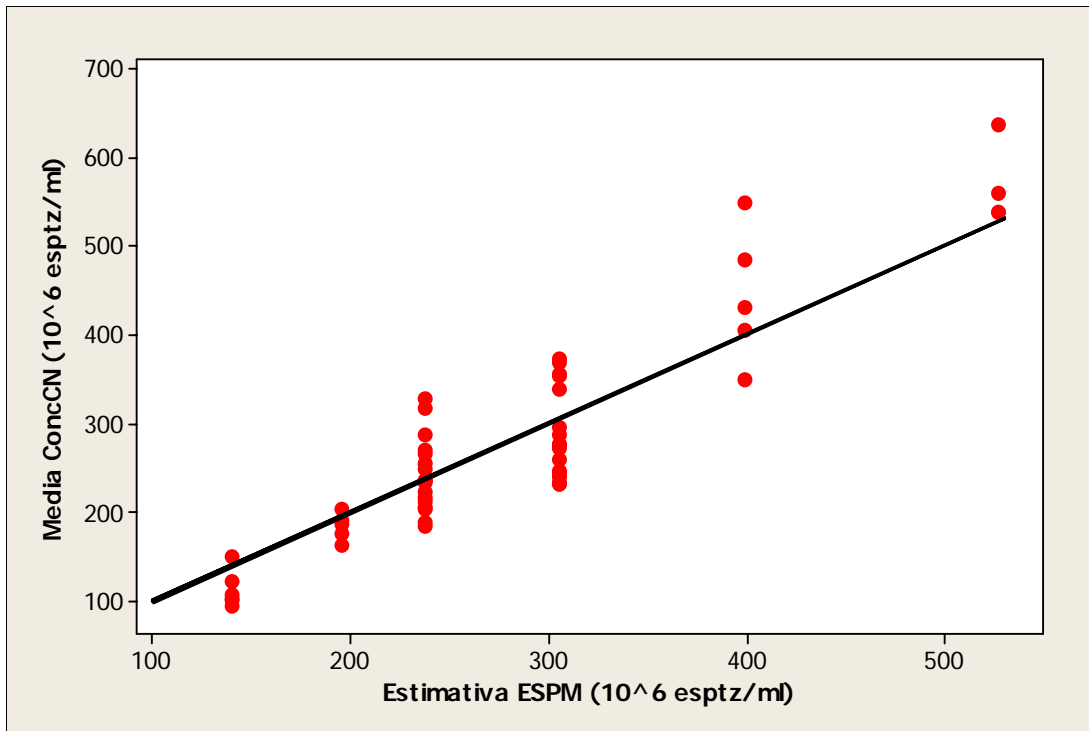


Figura 21 – Gráfico de dispersão da calibração de ESPM nos dados do Experimento 2

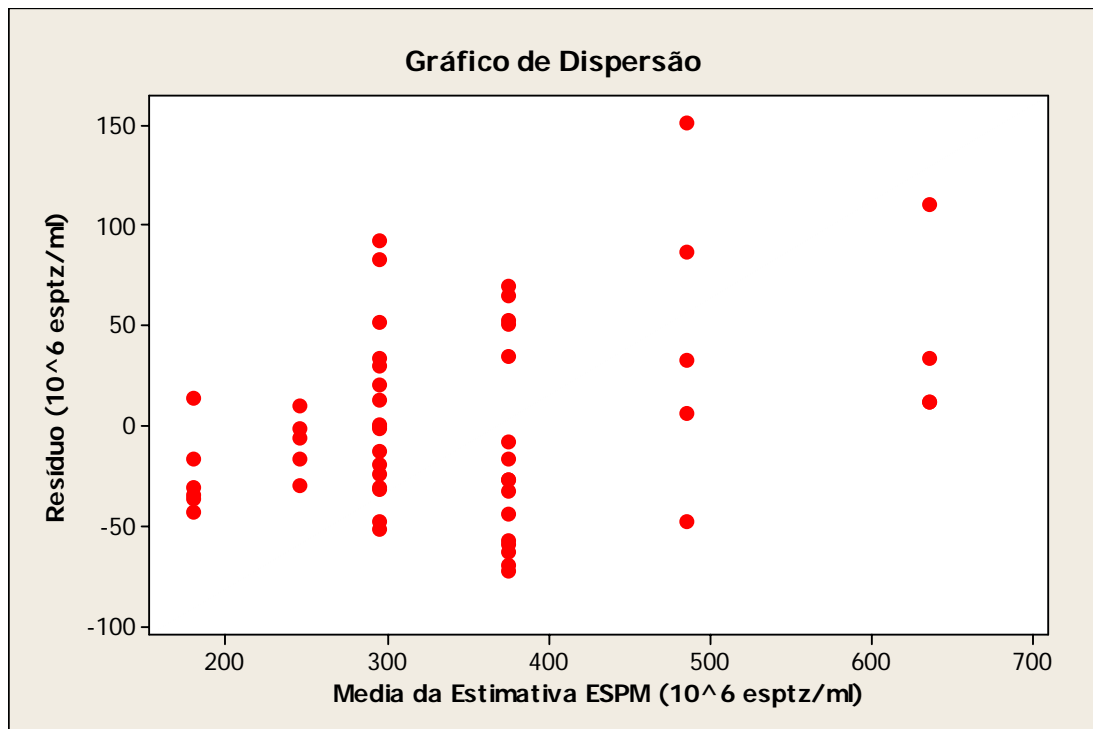


Figura 22 – Dispersão de resíduos da calibração de ESPM no Experimento 2

A figura 23 é o histograma do número de espermatozóides por dose quando é utilizada a calibração aplicada aos dados do Experimento 2.

Em contraste com a figura 8, sem calibração e aplicado sobre os dados do experimento 1, verifica-se que a distribuição se encontra centrada próxima ao valor 3×10^9 espermatozóides por mL, como desejado.

Tal fato é confirmado novamente comparando-se os resultados da Tabela de Karras e Tabela Ajustada LPS-FMVZ-USP com a CN (2,36 bilhões de espermatozóides vivos/dose vs 2,96 bilhões de espermatozóides vivos/dose, respectivamente).

A análise dos quantis da distribuição empírica da tabela 13 mostra que aproximadamente 22,6% das divisões em doses conterão um valor menor que $2,5 \times 10^9$ espermatozóides e aproximadamente 17,0% valor maior que $3,5 \times 10^9$ espermatozóides.

As estatísticas descritivas encontram-se na tabela 13.

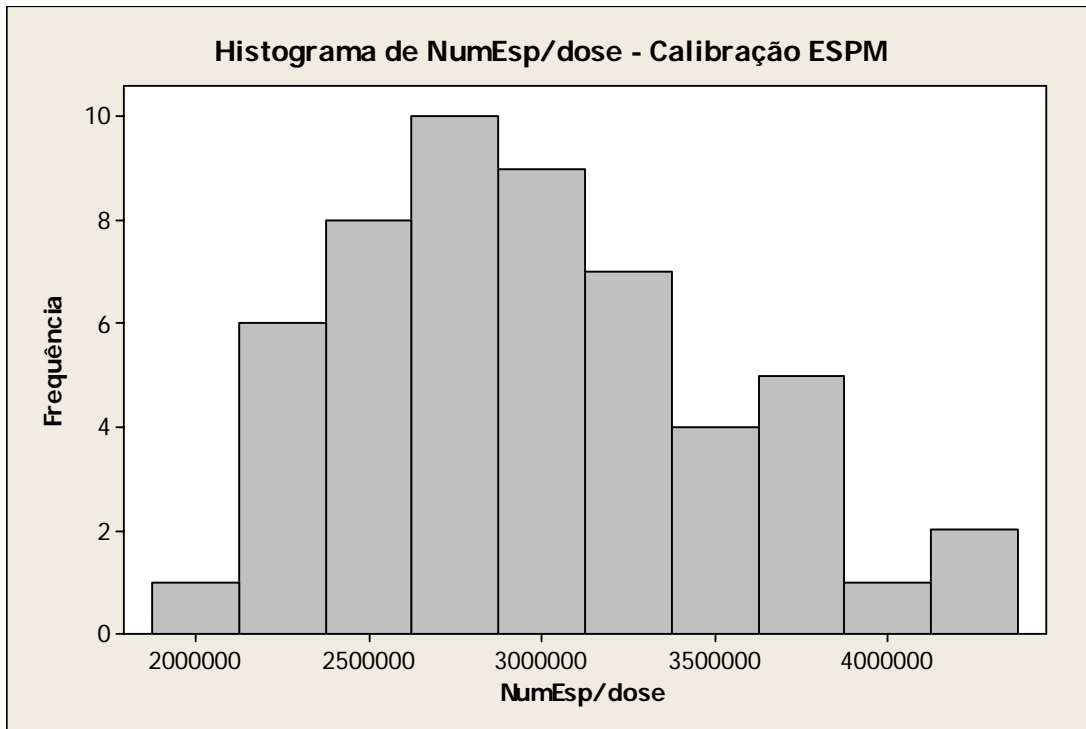


Figura 23 – Histograma do número de espermatozóides por dose – Calibração de ESPM

Tabela 13 – Estatísticas descritivas do número de espermatozóides por dose (Nº Esp./dose) ao adotar o ajuste do Modelo (1) em ESPM – São Paulo – 2006

Variável	N	Média	DP	Mínimo	Q1	Q3	Máximo
Nº Esp/Dose	53	$2,96 \times 10^9$	$516,6 \times 10^6$	$2,07 \times 10^9$	$2,58 \times 10^9$	$3,31 \times 10^9$	$4,17 \times 10^9$

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O ESPM e o ESPT são métodos indiretos de mensuração da concentração espermática, ou seja, utilizam a passagem de luz pelo ejaculado para a determinação da concentração espermática, sendo sujeitos a interferências de proteínas plasmáticas, células de descamação, sujidades e leucócitos presentes no ejaculado.

Dessa forma, era previsível a superestimação da concentração espermática destas técnicas em relação à CN, método direto de contagem dos espermatozoides.

No entanto, foi observado uma superestimação do ESPM e uma subestimação do ESPT, em relação à CN (Tabelas 3 e 5 e Figuras 9 e 10).

Provavelmente há uma descalibração do aparelho utilizado, sendo necessária a realização de um novo ajuste da tabela do ESPT. Como existem muitas marcas e modelos de ESPT no mercado e o ajuste da tabela acaba sendo específico para cada aparelho, não foi realizado o ajuste da tabela do ESPT.

Paulenz et al. (1995) observaram uma tendência do ESPT (SpermaCue®, HemoCue AB) em subestimar a concentração espermática em ejaculados altamente concentrados, comparando-se com a Câmara de Thoma (câmara de contagem celular similar à CN) e em superestimar a concentração espermática em ejaculados pouco concentrados.

Blom e Jensen (1984) encontraram uma variabilidade no total de sólidos do plasma seminal de cachorros durante todo o ano ($4,60 \% \pm 1,35 \%$ de sólidos no plasma seminal de cachorros), possivelmente devido a processos inflamatórios dos testículos dos cachorros que passam despercebidos clinicamente. Dessa maneira, esta variabilidade dificulta uma maior acurácia e precisão de técnicas indiretas, como o ESPT e ESPM.

O maior problema da subestimação da concentração espermática é econômico, onde se realiza inseminações com doses mais concentradas, subutilizando o potencial genético dos cachacos.

Pode-se observar na tabela 3 que um mesmo cachaco produz, em média, 4 doses a menos quando utiliza-se o ESPT. Assim, supondo 2 colheitas de sêmen por semana, 3 doses de sêmen para cada porca inseminada, taxa de parição de 90% e 11 leitões nascidos vivos/parto, deixaria-se de produzir 1.372 descendentes ao ano / cachaco.

Quanto ao efeito do número elevado de espermatozoides e volume da dose inseminante sobre a sobrevivência embrionária, Stratman e Self (1960) observaram que, tanto aos três dias, quanto aos 25 dias de inseminação, o número de espermatozoides ($2,5 \times 10^9$, $5,0 \times 10^9$ e $10,0 \times 10^9$ espermatozoides) não influenciou o número de embriões, em decorrência das altas concentrações utilizadas.

Com relação à superestimação da concentração espermática dos ejaculados suínos, como verificado no ESPM, o maior problema seria devido a possíveis falhas de fertilização, pois para que a fertilização seja efetiva, um número suficiente de espermatozoides deve estar presente no reservatório de sêmen na região caudal do istmo.

Os espermatozoides devem percorrer em torno de 1 a 2 m pelos cornos uterinos no fluido da dose inseminante, auxiliados principalmente pela contração longitudinal do útero, até alcançarem o local da fertilização.

No entanto, há no útero uma série de fatores que interferem negativamente, como refluxo, fagocitose dos espermatozoides pelos leucócitos presentes no útero e contração uterina (KRUEGER et al., 1999).

First et al. (1968) observaram que, transcorridos 15 minutos da inseminação, menos da metade dos espermatozoides é recuperada no útero.

Alguns destes fatores que impedem a chegada dos espermatozóides ao local de fertilização são, no entanto, controversos.

Há evidências de que a fagocitose só ocorre após a morte dos espermatozóides por outros processos, pois esta, se inicia 8 horas após a inseminação, enquanto que a perda de motilidade da maioria dos espermatozóides, se inicia entre 2 e 4 horas após a inseminação (FIRST et al., 1968).

Outro estudo demonstrou que a fagocitose ocorre 2 horas após a inseminação (STEVERINK et al., 1998).

Viring e Einarsson (1981) destacaram haver perdas decorrentes da rápida passagem dos espermatozóides para a cavidade abdominal via ovidutos, fenômeno também demonstrado em mulheres.

Outra barreira contra a passagem de espermatozóides para o local de fertilização é o refluxo, na medida em que menos células espermáticas ficam disponíveis para fertilização.

O volume do refluxo varia entre 1 e 56% **no momento da inseminação**, entre 3 e 16%, **30 minutos após a inseminação**, e entre 1 e 94% **de 30 minutos a 2 horas após a inseminação**.

A concentração média de espermatozóides em relação à dose inseminante, no refluxo, atinge, nos tempos destacados acima, os valores respectivos de $65 \pm 2,6\%$, $40 \pm 1,5\%$ e $26 \pm 1,4\%$, devido à elevada correlação entre o volume de refluxo e o número de espermatozóides no refluxo ($r=0,97$, $r=0,73$ e $r=0,87$).

Steverink et al. (1998) concluíram que o volume do refluxo é indicativo do número de espermatozóides no refluxo, influenciando negativamente na porcentagem de embriões normais ($P<0,05$), quando a dosagem sub-ótima é utilizada.

Existem evidências de que o tamanho do útero influi no volume do refluxo, já que primíparas têm refluxo maior (>20 mL) que pluríparas (STEVERINK et al., 1998).

Em razão destes fatores impedirem que grande parte dos espermatozóides alcancem o local de fertilização, infere-se que a consequência do uso de doses menores que 2×10^9 espermatozóides implica em diminuição das taxas de fertilidade das fêmeas.

Inseminações com 5×10^9 e 10×10^9 espermatozóides, resultaram em maior número de espermatozóides no oviduto e maior porcentagem de oócitos fertilizados que inseminações com 1×10^9 espermatozóides/dose (BAKER et al., 1968).

Geralmente a dose tende a afetar a porcentagem de embriões normais, sendo respectivamente, de $78 \pm 0,3\%$, $84 \pm 0,3\%$ e $91 \pm 0,4\%$ para doses iguais a 1×10^9 , 3×10^9 e 6×10^9 (STEVERINK et al., 1997).

Em estudo que avaliou a situação geral da IA nos EUA, a concentração espermática variou de 2,5 a 4×10^9 espermatozóides/dose, num volume oscilando de 70 a 100 ml, sendo que doses de apenas de 1,5 a 2×10^9 eram aceitáveis quando a detecção do cio e os programas de IA eram eficientemente aplicados (SINGLETON, 2001).

Outra pesquisa que relacionava parâmetros que prediziam a qualidade do sêmen dos cachacos com a fertilização *in vivo*, utilizando-se doses ótimas e sub-ótimas de sêmen, respectivamente, 3×10^9 e $0,3 \times 10^9$ espermatozóides/dose, sendo a última obtida mediante diluição 10 vezes maior que a dose de 3×10^9 em "Beltsville Thawing Solution", verificou que a taxa de ovulação era menor com a dose de $0,3 \times 10^9$, conforme mostrado pelo número de corpos lúteos $12,2 \pm 3,5$ e $8,6 \pm 4,2$, respectivamente, para as doses ótimas e subótimas.

Esse resultado foi atribuído, possivelmente, à diminuição dos componentes do plasma seminal com o aumento da diluição (TARDIF et al., 1999).

Brackem et al. (2003) estudaram o efeito da realização de uma única inseminação artificial com doses de 0,5 (T1) e 3,0 bilhões de espermatozóides vivos (T2) e duas inseminações com doses de 3 bilhões de espermatozóides vivos (T3), sobre a taxa de fertilização dos oócitos em suínos.

A taxa de fertilização foi de $34,5 \pm 8,9$, $56,5 \pm 14,4$ e $77,2 \pm 16,4$, respectivamente para T1, T2 e T3.

Mais uma vez comprovou-se a importância do número de espermatozóides viáveis das doses inseminantes sobre a fertilização dos oócitos em suínos, mas ressalta-se que a concentração utilizada foi muito baixa (0,5 bilhões de espermatozóides vivos / dose) para uma inseminação convencional, onde o sêmen diluído é depositado intracervical.

A redução da dose inseminante em até 1 bilhão de espermatozóides viáveis não apresentou influência negativa quando realizada intra-uterina (WATSON; BEHAN, 2002).

A correta mensuração da concentração espermática do ejaculado suíno torna-se imprescindível também, quando se realiza a inseminação artificial intra-uterina (IAIU), visto que se utiliza doses com pequenas concentrações espermáticas (1 bilhão de sptz vivos/dose) e qualquer variação na concentração da dose inseminante, principalmente quando há superestimação da concentração espermática, poderá acarretar em falhas de fertilização.

Atualmente já existem técnicas computadorizadas de mensuração de parâmetros de qualidade do ejaculado suíno, inclusive concentração espermática.

Hamilton Thorne Computer-Based Semen Analyzer (HTR) e Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) são equipamentos disponíveis comercialmente para análise objetiva e precisa de motilidade, concentração espermática e morfologia.

No entanto, o seu uso em Centrais de Inseminação Artificial em Suínos (CIAS) no Brasil ainda está muito distante, principalmente devido ao elevado custo destes equipamentos.

Vyt et al. (2004) compararam o resultado de concentração espermática de ejaculados suínos pelo HTR e pela Câmara de Bükler, câmara semelhante à Câmara de Neubauer, onde evidenciou-se a subestimação do HTR em relação à Câmara de Bükler.

Entretanto, Mahmoud et al. (1997) encontraram que a Câmara de Bükler também superestima a concentração espermática em relação a outras câmaras.

Maiores informações sobre estas técnicas, como repetibilidade sobre o mesmo ejaculado, comparação entre o CASA, HTR e CN seriam importantes para avaliar melhor a CN a campo.

Embora não tenham sido encontrados dados na literatura comparando especificamente o ESPM, ESPT e CN quanto a repetibilidade e tempo gasto em cada técnica, Brillard e McDaniel (1985) observaram um coeficiente de variação (CV) de 17,9% e 540 s de tempo gasto com a CN.

No presente estudo, o tempo gasto na realização da CN foi de 129 s, mas seria maior se fossem cronometrados os dois campos de contagem da CN.

Paulenz et al. (1995) observaram um CV de 12,3% e 2,9%, respectivamente para Câmara de Thoma e Espectrofotômetro.

Segundo Woelders (1990 apud PAULENZ et al., 1995, p. 110) a mensuração da concentração espermática através de câmaras de contagem celular pode ser heterogênea e a contagem dos espermatozóides por toda a profundidade da câmara é dificultoso.

WOELDERS, H. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN BOAR SEMEN CONSERVATION, 2., 1990, Beltsville. **Proceedings...** p. 145-164.

Em relação ao ESPT, o autor relata que a quantidade de luz que atravessa os espermatozoides em suspensão depende do seu tamanho, forma e índice de refração.

Quando estes parâmetros são diferentes entre cachacos, não há uma única curva de calibração válida para todos os cachacos.

Como foi observado nas figuras 11 e 12, o volume do ejaculado pouco influenciou os resultados do ESPM e ESPT.

Dessa maneira, não foi sustentada a hipótese de que o aumento do volume do ejaculado diluiria os fatores como proteínas plasmáticas, leucócitos, células de descamação e sujidades, que influenciam os resultados das técnicas indiretas de mensuração espermática, como o ESPM e o ESPT.

Nas tabelas 6, 7 e 8 e nas figuras 16 e 17 pode-se observar um elevado grau de concordância entre os dois técnicos para ESPM, no entanto fica evidente que em ejaculados mais concentrados o grau de discordância aumenta também.

Isto se deve ao crescente intervalo entre cada valor da tabela do ESPM (Tabela 1), ou seja, quanto maior a concentração espermática, maior é a diferença entre valores de concentração espermática próximos.

Por exemplo, a diferença da concentração espermática entre valores do ESPM de 95 e 90 é de apenas **15 x 10⁶ sptz/mL** (150 - 135 x 10⁶ sptz/mL), enquanto que a diferença da concentração espermática entre valores do ESPM de 25 e 20 é de **80 x 10⁶ sptz/mL** (635 - 555 x 10⁶ sptz/mL).

A tabela ajustada para ESPM utilizando os dados do Experimento 1 mostrou-se eficaz utilizando-se os dados do Experimento 2. Entretanto, maiores informações de outras CIAS utilizando esta tabela ajustada são essenciais para a comprovação de sua eficácia a campo.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O Espectrofotômetro tende a subestimar e o Espermiométrico a superestimar a concentração espermática em comparação com a Câmara de Neubauer.

A calibração estabelecida através dos dados do Experimento 1 com o Espermiométrico foi efetiva ao ser testada nos dados do Experimento 2, ou seja, através da correção de escala do Espermiométrico, o número de espermatozoides obtido na divisão do ejaculado em doses inseminantes fica mais próximo ao obtido utilizando a Câmara de Neubauer, técnica padrão.

A estimativa da proporção de mensurações da concentração espermática concordantes obtidas pelos técnicos 1 e 2 no Espermiométrico foi elevada, e essa proporção não é dependente da concentração espermática. Além disso, as proporções de discordância positiva e negativa não mudam em função da concentração.

O Espermiométrico foi a técnica de mensuração espermática mais prática, vindo em seguida o Espectrofotômetro e por último a Câmara de Neubauer.

Da mesma maneira, o Espermiométrico apresentou maior repetibilidade, em comparação com as demais técnicas avaliadas.

A Tabela ajustada do Espermiométrico produzida com os dados do Experimento 1 apresentou valores mais aproximados aos da Câmara de Neubauer.

Com base nos resultados descritos anteriormente, a técnica mais indicada para as Centrais de Inseminação Artificial brasileiras é a técnica do Espermiométrico de Karras.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BAKER, R. D.; DZIUK, P. J.; NORTON, H. W. Effect of the volume of semen and drugs on transport of sperm in artificial inseminated gilts. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 88-93, 1968.
- BLOM, E.; JENSEN, P. T. Studies on boar semen – III Sperm concentration and seminal plasma total solids followed in Danish AI boars through a 10-years-period. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 25, p. 107-112, 1984.
- BRACKEM, C. J.; SAFRANSKI, T. J.; CANTLEY, T. C.; LUCY, M. C.; LAMBERSON, W. R. Effect of time of ovulation and sperm concentration on fertilization rate in gilts. **Theriogenology**, v. 60, p. 669-676, 2003.
- BRILLARD, J. P.; MCDANIEL, G. R. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. **Journal of Poultry Science**, v. 64, p. 155-158, 1985.
- BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 5. ed. São Paulo: Saraiva, 2002. 526 p.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, v. 109, p. 367-373, 1993.
- EVENSON, D. P.; PARKS, J. E.; KAPROTH, M. T.; JOST, L. K. Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 86-94, 1993.
- FIRST, N. L.; SHORT, R. E.; PETER, J. B.; STRATMAN, F. W. Transport and loss of boar spermatozoa in the reproductive tract of the sow. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 1037-1040, 1968.
- GARCÍA RUVALCABA, J. A.; LAPUENTE, S.; CORCUERA, D.; SAGÜÉS, A.; MARTÍN RILLO, S. Avaliação prática do sêmen. **Suínocultura Industrial**, n. 21, p. 32-35, 1999.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995. 582 p.

KEMP, B.; SOEDE, N. M. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 52, p. 79-89, 1997.

KRUEGER, C.; RATH, D.; JOHNSON, L. A. Low dose insemination in synchronized gilts. **Theriogenology**, v. 52, p. 1363-1373, 1999.

MAHMOUD, A. M. A.; DEPOORTER, B.; PIENS, N.; COMHAIRE, F. H. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. **Fertility and Sterility**, v. 68, p. 340-345, 1997.

PAULENZ, H.; GREVLE, I. S.; TVERDAL, A.; HOFMO, P. O.; BERG, A. Precision of the Coulter Counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 30, p. 107-111, 1995.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS user's guide: Versão 8.2. Cary: SAS, 2001. 1 CD – ROM.

SHIPLEY, C. Breeding Soundness examination in the boar. **Swine Health and Production**, v. 7, p. 117-120, 1999.

SINGLETON, W. L. State of art in artificial insemination of pigs in the United States. **Theriogenology**, v. 56, p. 1305-1310, 2001.

SOEDE, N. M.; KEMP, B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 91-103, 1997.

SOKOL, R. Z.; SHULMAN, P.; PAULSON, R. J. Comparison of two methods for the measurement of sperm concentration. **Fertility and Sterility**, v. 73, p. 591-594, 2000.

STEVERINK, D. W. B.; SOEDE, N. M.; BOUWMAN, E. G.; KEMP, B. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, p. 165-171, 1997.

STEVERINK, D. W. B.; SOEDE, N. M.; BOUWMAN, E. G.; KEMP, B. Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 109-119, 1998.

STRATMAN, F. W.; SELF, H. L. Effect of semen volume and number of sperm on fertility and embryo survival in artificially inseminated gilts. **Journal of Animal Science**, v. 19, p. 1081-1088, 1960.

TARDIF, S.; LAFOREST, J. -P.; CORMIER, N.; BAILEY, J. L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. **Theriogenology**, v. 52, p. 447-459, 1999.

TOMLINSON, M.; TURNER, J.; POWELL, G.; SAKKAS, D. One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods?. **Human Reproduction**, v. 16, p. 121-124, 2001.

VIRING, S.; EINARSSON, S. Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts. **Nordish Veterinaire Medicine**, v. 33, p. 145-149, 1981.

VYT, P.; MAES, D.; RIJSSELAERE, T.; DEJONCKHEERE, E.; CASTRYCK, F.; VAN SOOM, A. Motility Assessment of Porcine Spermatozoa: a Comparison of Methods. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 447-453, 2004.

WATSON, P. F.; BEHAN, J. R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**, v. 57, p. 1683-1693, 2002.

XUE, J.; DIAL, G. D.; TRIGG, T.; DAVIES, P.; KING, V. L. Influence of mating frequency on sow reproductive performance. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2962-2966, 1998.